



universität  
wien

# MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Automatisierte Herstellung Rekombinanter Mutanten für  
die Biophysikalische Charakterisierung Allosterischer  
Modulierung in DC-SIGN

verfasst von / submitted by

Gregor Suchy, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Magister pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2022 / Vienna 2022

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof.Dr. Christoph Rademacher

## Zusammenfassung

DC-SIGN ist ein Protein aus der Familie der C-Typ Lektine und besitzt eine charakteristische Kohlenhydraterkennungsdomäne, die eine  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Bindung von Kohlenhydraten ermöglicht. DC-SIGN reguliert unter anderem Dendritischen Zellen und beeinflusst deren Migration und Adhäsion. Außerdem spielt es eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen, der Aktivierung von T-Zellen oder der Regulation der Immunantwort. Unter physiologischen Bedingungen wird die Homöostase aufrechterhalten, unter pathologischen wird die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren stimuliert. Daher wird auch eine Beteiligung bei der Entstehung von Autoimmun- oder Entzündungskrankheiten diskutiert. Ein weiterer Punkt ist die Rolle von DC-SIGN bei der Umgehung der Immunantwort durch Viren und anderer Pathogene.

Trotz des Interesses an DC-SIGN aufgrund seines möglichen therapeutischen Potentials konnten noch keine arzneimittelähnlichen Moleküle, die an die primäre Bindestelle von DC-SIGN binden, entwickelt werden, da diese sehr hydrophil ist. Vorige Studien weisen jedoch auf die Existenz von sekundären Bindestellen hin, die DC-SIGN potentiell allosterisch beeinflussen könnten. Der Mechanismus dafür ist jedoch nicht bekannt.

Um die sekundären Bindestellen und das dazugehörige allosterische Netzwerk näher zu charakterisieren wurden Molecular Dynamics-Simulationen durchgeführt, die allosterische Potential für die sekundäre Bindestelle vorhersagten. Als Folge davon wurde eine Hypothese über das allosterische Netzwerk von DC-SIGN erstellt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Mutanten des Proteins durch Austausch einzelner Aminosäuren an vielversprechenden Positionen in der Sequenz erstellt. Mit Hinblick auf das allosterische Netzwerk, könnten diese Mutationen zur Modulierung der sekundären Bindestelle führen, was wiederum Faktoren wie die Konformationsänderung, Kohlenhydratspezifität, Bindungsaffinitäten und auch die primäre Bindungsstellen beeinflussen könnte. Mit funktionalen Assays können WT und Mutanten verglichen werden.

Die Aufreinigung von DC-SIGN und seinen Mutanten erfolgt mittels FPLC über eine IMAC-Säule. Durch die Integration eines Autosamplers in das System ist es möglich, die automatische Aufreinigung mehrerer, verschiedener Proteinproben hintereinander

zu gewährleisten. Dies erleichtert die Bereitstellung ausreichender Mengen von DC-SIGN und seinen Mutanten für weitere Experimente wie NMR und verschiedene Assays.

## Abstract

DC-SIGN is a protein of the C-type lectin superfamily and contains a characteristic carbohydrate recognition domain that enables  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent binding of carbohydrates. Among other things, DC-SIGN regulates dendritic cells and influences their migration and adhesion. In addition to that, it plays an important role in inflammatory responses, activation of T-cells or regulation of the immune response. Under physiological conditions, homeostasis is maintained; under pathological conditions, the release of proinflammatory mediators is stimulated. Therefore, an involvement in the development of autoimmune or inflammatory diseases is also discussed. Another aspect is the role of DC-SIGN in evading the immune response by viruses and other pathogens.

Despite the interest in DC-SIGN because of its possible therapeutic potential, no drug-like compounds which bind to the primary binding site of DC-SIGN have been developed yet, because it is highly hydrophilic. However, previous studies indicate the existence of secondary binding sites that could potentially allosterically affect DC-SIGN. The mechanism for this is not known though.

To further characterize the secondary binding sites and the associated allosteric network, molecular dynamics simulations were performed which predicted allosteric potentials for the secondary binding site. Consequently, a hypothesis about the allosteric network of DC-SIGN was made. Based on these results, mutants of the protein were created by replacing individual amino acids at promising positions in the sequence. With respect to the allosteric network of DC-SIGN, these mutations could lead to modulation of the secondary binding site, which in turn could affect factors such as conformational change, carbohydrate specificity, binding affinities, and also primary binding sites. Functional assays can be used to compare WT and mutants.

Purification of DC-SIGN and its mutants is performed by FPLC over an IMAC column. By integrating an autosampler into the system, it is possible to ensure automatic purification of multiple, different protein samples in succession. This facilitates the provision of sufficient amounts of DC-SIGN and its mutants for further experiments such as NMR and various assays.

## Danksagung

Zuallererst gilt mein Dank Prof. Christoph Rademacher, für die Möglichkeit die Masterarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu machen, die gute Betreuung und Unterstützung, und die Chance, in einem Biochemie-Labor Erfahrung zu sammeln. Außerdem bekam ich die Möglichkeit nach Abschluss des praktischen Teils meiner Arbeit für weitere fünf Monate als Studienassistentin weiterzuarbeiten – eine Zeit, die ich wirklich nicht missen möchte.

Des Weiteren möchte ich mich bei Jonathan Lefèbre für seine Unterweisungen und Erklärungen bezüglich Laborarbeit und theoretischem Hintergrund, für die Betreuung des praktischen und schriftlichen Teils meiner Arbeit und für die Antworten auf fast alle Fragen bedanken, obwohl wir manchmal leichte „Sprachbarrieren“ überwinden mussten.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Molecular Drug Targeting-Gruppe für die großartige Zeit und die gute Atmosphäre bedanken. Der Spaß kam auch nie zu kurz und ich konnte einige neue Hawara finden.

Abschließend gilt größter Dank meinen Eltern, die mir das Studium überhaupt ermöglicht haben, immer hinter mir gestanden sind und an mich geglaubt haben. Auch die Unterstützung und Verständnis meiner restlichen Familie und meiner Freunde hat mir während meiner Studienzeit sehr viel bedeutet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>4</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 C-Typ Lektine</b> .....	<b>7</b>
1.1.1 Definition der C-Typ Lektin-Familie .....	7
1.1.2 Struktur.....	7
1.1.3 Aufgaben von CLR <sub>s</sub> im Immunsystem .....	9
1.1.4 CLR <sub>s</sub> und die Immunantwort.....	10
1.1.5 Potentielle Anwendungsmöglichkeiten .....	11
<b>1.2 Dendritische Zellen</b> .....	<b>12</b>
1.2.1 Funktion von DC <sub>s</sub> im Immunsystem.....	12
<b>1.3 DC-SIGN</b> .....	<b>13</b>
1.3.1 Immunregulation von DC <sub>s</sub> .....	13
1.3.2 Struktur.....	14
1.3.3 Die Rolle von DC-SIGN in der Immunantwort .....	16
1.3.4 DC-SIGN Mutanten .....	18
<b>1.4 Bakterielle Expression rekombinanter Proteine</b> .....	<b>20</b>
1.4.1 Vorteile bakterieller Expressionssysteme .....	20
1.4.2 <i>Escherichia coli</i> als Wirt .....	20
1.4.3 Andere bakterielle Wirte als <i>E. coli</i> .....	22
1.4.4 Affinität-Tags zur Aufreinigung rekombinanter Proteine .....	23
1.4.5 Rückfaltung der Proteine.....	24
1.4.6 Aufreinigung rekombinanter Proteine .....	26
<b>1.5 Ziele der Arbeit</b> .....	<b>32</b>
<b>2 Materialien &amp; Methoden</b> .....	<b>33</b>
<b>2.1 Proteinexpression und -aufreinigung</b> .....	<b>33</b>
2.1.1 DC-SIGN ECD Wildtyp (WT) + Mutanten .....	33
2.1.2 DC-SIGN CRD WT + Mutanten:.....	34
<b>2.2 Automatisierung des Aufreinigungsvorganges mittels FPLC</b> .....	<b>35</b>
<b>2.3 Durchgeführte Assays</b> .....	<b>40</b>
2.3.1 HRP-Assay.....	40
2.3.2 Biotin-Streptavidin-HRP-Assay .....	40
<b>2.4 Verwendete Puffer</b> .....	<b>41</b>

2.5	Verwendete Medien für die Expression.....	43
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Integration des Autosamplers.....	47
3.2	DC-SIGN CRD – Ausbeute .....	48
3.3	DC-SIGN ECD – Ausbeute .....	49
3.4	Auswertung der funktionalen HRP-Assays.....	50
3.4.1	Analyse des Biotin-Streptavidin-HRP-Assays .....	50
3.4.2	HRP-Assay.....	51
4	Diskussion.....	55
4.1	Autosampler .....	55
4.2	HRP-Assay und Biotin-Streptavidin-HRP-Assay .....	57
	Literaturverzeichnis.....	59
	Abbildungsverzeichnis.....	67
	Tabellenverzeichnis.....	68
	Abkürzungsverzeichnis.....	69
	Appendix.....	71

# 1 Einleitung

## 1.1 C-Typ Lektine

### 1.1.1 Definition der C-Typ Lektin-Familie

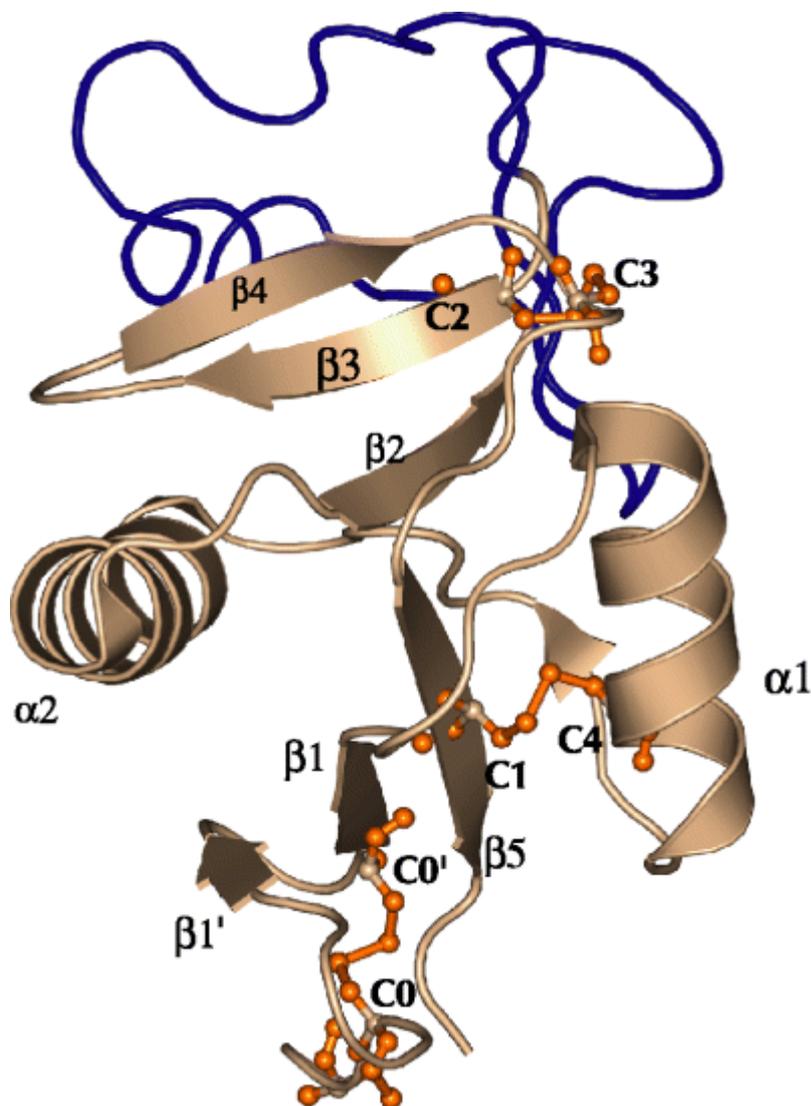
C-Typ Lektinrezeptoren (CLRs) stellen eine große Familie von glykanbindenden Proteinen (GBPs) dar, die eine charakteristische C-Typ-Lektin-Domäne (CTLD) besitzen, welche klassischerweise als Kohlenhydraterkennungsdomäne (CRD = carbohydrate recognition domain) definiert ist (Drickamer, 1999). Die Begriffe C-Type Lektin, CRD, C-Typ-Lektin-Domäne, C-type lectin-like domain (auch CTLD) werden synonym verwendet. „C-type lectin“ wurde als Bezeichnung gewählt, um  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige (C-type) Kohlenhydrat bindende Proteine von anderen,  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängigen zu unterscheiden. Die Kohlenhydrat-Bindungs-Aktivität wird durch die CRD vermittelt, welche in allen  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen Lektinen vorkommt (Zelensky and Gready, 2005).

CLRs erkennen komplexere Zuckereinheiten, die auf Glykoproteinen und -lipiden exprimiert werden. Auch Monosaccharide wie Mannose, Fucose und Galactose werden spezifisch mit niedriger Affinität erkannt. Die Spezifität von CLRs scheint durch die Multimerisierung der Rezeptoren, die Verzweigung der Kohlenhydratketten und das Protein-Backbone des Glykoproteins, welches die Kohlenhydratstruktur ausstellt, festgelegt zu sein (Drickamer, 1999).

### 1.1.2 Struktur

Die Struktur der CTLD wird als Doppelschleife beschrieben: Die gesamte Domäne ist eine Schleife, mit N- und C-terminalen  $\beta$ -Strängen, die ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt bilden (*Abb. 1*). Dieses wird durch zwei flankierende  $\alpha$ -Helices und ein dreisträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt verbunden. Letzteres ist Teil des hydrophoben Kerns und enthält das konservierte Trp-Ile-Gly-Leu (WIGL) Motiv. Vier Cysteinreste bilden zwei hoch konservierte Disulfidbrücken, durch welche die gesamte Domäne stabilisiert. Die zweite

Schleife wird als „lange Schleife“ bezeichnet, liegt innerhalb der Domäne und ist für die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kohlenhydratbindung verantwortlich. In dieser flexiblen langen Schleifenstruktur befinden sich bis zu drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Stellen (I-III), die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über geladene Aminosäuren koordinieren. Obwohl die Belegung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stellen I-III zwischen verschiedenen CLRns variiert und auch eine vierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Stelle beschrieben wurde, wird die kanonische Kohlenhydratbindung ausschließlich über die  $\text{Ca}^{2+}$ -Stelle II zusammen mit einer Triade konservierter Aminosäuren vermittelt, die eine Spezifität gegenüber verschiedenen Monosaccharidarten innerhalb der Kohlenhydratbindungsstelle (CBS, carbohydrate binding site) verleiht (Zelensky and Gready, 2005).



**Abbildung 1: Darstellung einer typischen CTLD:** In blau ist die lange Schleife dargestellt, die auch bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kohlenhydratbindung eine Rolle spielt. Die beta-Stränge 1 und 5 formen ein antipa-

rales beta-Faltblatt. Die Cysteinreste formen Disulfidbrücken (in orange dargestellt) (Zelensky and Gready, 2005) .

### **1.1.3 Aufgaben von CLRs im Immunsystem**

CLRs sind ein wichtiger Teil der angeborenen Immunantwort, die in der Erkennung von Pathogenen eine bedeutende Rolle spielen und mitentscheiden, wie sich die adaptive Immunantwort entwickelt (Kingeter and Lin, 2012).

Die meisten CLRs wirken als Antigen-Rezeptoren, die an der Aufnahme der Antigene und deren Präsentation beteiligt sind (Engering et al., 2002). Sie funktionieren als Pattern recognition Rezeptoren (PRRs), die Kohlenhydratliganden von Mikroorganismen erkennen. Sie induzieren zahlreiche Signaltransduktionskaskaden durch ihre eigenen ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) oder ITAM-enthaltenden Adapterproteine. Der Signalweg führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear factor kappa B (=NF-kappa B), was eine bedeutende Rolle in der angeborenen Immunantwort und bei Entzündungen in Folge von mikrobieller Infektion und Zellschädigung spielt (Kingeter and Lin, 2012). NF-kappa B steuert die Expression von Genen, die an der Zellproliferation, Apoptose und Lymphozytenaktivierung beteiligt sind, sowie die Expression vieler proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (Oeckinghaus et al., 2011).

Die Phagozytose extrazellulärer Pathogene oder apoptotischer Zellen kann durch Rezeptor-Engagement ausgelöst werden. Makrophagen und DC besitzen eben diese PRRs an der Zelloberfläche, welche pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) oder damage-associated molecular patterns erkennen – dabei handelt es sich um Proteine, Kohlenhydrate oder Nukleinsäurestrukturen, welche typisch für Pathogene sind oder nur im Fall von Zellschädigung präsentiert werden. Die Antigen-Präsentation zeigt also eine Infektion oder Zellschädigung an. Durch die Bindung eines PAMP an den PRR wird die Signaltransduktion ausgelöst. Dies hat zur Folge, dass es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie des bereits erwähnten NF-kappa B kommt, was zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine führt, welche wiederum Leukozyten - wie neutrophile Granulozyten - zum Ort der Entzündung oder des Schadens locken, führt. Zu den PRRs gehören neben den CLRs auch Toll-like receptors (TLRs), RIG-I-like receptors (RLRs) und NOD-like receptors (NLRs) (Kumar et al.,

2011). TLRs sind ebenso Schlüsselrezeptoren für die Induktion intrazellulärer Signalkaskaden nach der Erkennung eines Pathogens, da die TLR-Ligation zur Reifung und Aktivierung von Dendritischen Zellen (DCs) führt, was ebenso für die Aktivierung der Immunantwort und die Induktion von Effektor-T-Zelle von Bedeutung ist (Gantner et al., 2003). C-Typ-Lektine erkennen auch Kohlenhydratstrukturen auf eigenen Glykoproteinen, um eine Toleranz gegenüber eigenen Antigenen zu ermöglichen (Figdor et al., 2002).

#### **1.1.4 CLRs und die Immunantwort**

Die Immunantwort ist zweiphasig: Initial wirkt die angeborene, dann die pathogen-spezifische, adaptive. Die angeborene wird hauptsächlich durch Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophilen Granulozyten vermittelt und läuft nach Kontakt mit dem Pathogen schnell ab. Die Adaptive wird durch T- und B-Zellen kontrolliert und tritt nach einigen Tagen ein. Die angeborene ist nicht pathogen-spezifisch, jedoch entscheidend für die Entwicklung der adaptiven Antwort. Die Phagozyten (DCs, Makrophagen) präsentieren den T-Zellen in den Lymphknoten die pathogen-assoziierten Proteine. Auf diese Weise teilt das angeborene Immunsystem den Zellen des adaptiven mit, dass eine Infektion stattgefunden hat, und die entsprechenden erregerspezifischen adaptiven Lymphozyten werden aktiviert (Kingeter and Lin, 2012).

Einige Pathogene haben verschiedenste Strategien entwickelt, um der schützenden Wirtsantwort auszuweichen, indem sie die Funktion von PRRs untergraben. So können Pathogene das intrazelluläre Routing von CLRs ausnutzen, um der Antigen(AG)-Präsentation zu entkommen oder den cross-talk zwischen CLR und TLR signalling zu stören (Gantner et al., 2003). Es wird auch von Pathogenen berichtet, die durch Hemmung der AG-Präsentation oder durch Modifizierungen die T-Zell-Antwort untergraben. Sie zielen beispielsweise auf die CLRs DC-SIGN und Dectin-1 ab (Geijtenbeek et al., 2004). Manchen Infektionserregern und auch Krebszellen gelingt es über diverse Mechanismen die Antigenerkennung, -verarbeitung und -reifung zu umgehen, zu unterdrücken oder sogar auszunutzen, so dass die diversen Immunreaktionen unwirksam werden (Bermejo-Jambrina et al., 2018). AG-Aufnahme durch CLRs führt nicht zwingend zur Induktion potenter Effektor-T-Zellen, aber erleichtert die Antigen-Präsentationskapazität von DCs. Dieser Uptake durch CLRs ohne TLR Ligation kann

Antigen-spezifische Toleranz hervorrufen, was hilfreich zur Unterdrückung der Immunantwort sein könnte, und auch vorteilhaft für die Autoimmunität (Gantner et al., 2003).

Die Aktivierung von DCs und die Antigen-Präsentation durch DCs spielt eine Schlüsselrolle bei der Einleitung der antitumoralen Antwort. Tumorzellen nutzen einige Strategien, um die AG-Präsentation und T-Zell-Antwort zu dämpfen. TAAs (tumour-associated antigens), die mit DCs interagieren, können die Funktion von DCs modifizieren, wie zum Beispiel die Produktion immunsuppressiver Zytokine (Denda-Nagai and Irimura, 2000). Einige Studien legen den Fokus darauf, die Immunantwort durch gezielte Antigene für CLRs zu verbessern. In Kombination mit TLR Ligation soll dies insbesondere für die Induktion der Anti-Tumor-Antwort bei Krebs von Nutzen sein (Kapsenberg, 2003).

Auch bei der Immunantwort gegen Pilzinfektionen spielen C-Typ Lektin-Rezeptoren eine Schlüsselrolle. So erkennen CLRs wie Dectin-1/2/3 und Mincle Bestandteile der Zellwand von Mikroorganismen durch ihre CRD. Daraufhin werden zahlreiche Signaltransduktionskaskaden durch ihre eigenen ITAMs oder Interaktion mit ITAM-enthaltenden Adapterproteinen induziert, was schließlich zur Aktivierung NF-kappa B führt (Hou et al., 2017).

### **1.1.5 Potentielle Anwendungsmöglichkeiten**

CLRs sind in der Lage mit anderen PRRs synergistisch die Immunantwort zu entwickeln und Leukozyten aktivieren. Außerdem tragen sie möglicherweise zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen bei (Kingeter and Lin, 2012). Durch die Bedeutung für das Immunsystem zielen immer mehr Impfungen und medikamentöse Behandlungsstrategien auf CLRs ab, um die Immunantwort entweder zu verstärken oder zu unterdrücken (Unger and van Kooyk, 2011). Durch Ansätze wie AG-gekoppelte Antikörper, die auf CLRs auf DCs abzielen (zum Beispiel DEC205) oder durch den Einsatz synthetischer CLR-Liganden (wie den Mincle-Agonist Trehalose-Dibehenat) kann die Wirksamkeit von Impfstoffen erhöht werden. Die Stimulierung mit C-Typ Lektinen kann sowohl angeborene als auch adaptive Immunantworten auslösen, die vor infektiösen und nicht-infektiösen Krankheiten schützen (Brown et al., 2018).

Das Abzielen auf CLRs kann beispielsweise zur Verbesserung der Anti-Tumor Antwort genutzt (He et al., 2007). Neben dem Antikörper-vermittelten CLR-Targeting, welches lange Zeit die bevorzugte Strategie war, stellt das Glykan-basierte Targeting eine viel-

versprechende Alternative dar (van Kooyk et al., 2013). Vorteile sind zum Beispiel die Möglichkeit, die Ligandendichte zu variieren und die räumliche Ausrichtung der Liganden zu verändern (Johannssen and Lepenies, 2017). Außerdem können verschiedene Liganden auf demselben Träger präsentiert werden, was das gleichzeitige Abzielen auf mehrere CLRs ermöglicht. Eine Vielzahl von Trägern kann für diese multivalente Darstellung von Glykanliganden verwendet werden: glykanmodifizierte AGs, Glykonanopartikel, Glykoliposomen oder Glykodendrimere. So wurden Tumorantigene, die mit Glykanliganden für DC-SIGN modifiziert wurden, erfolgreich für das Abzielen auf DC-SIGN eingesetzt und führten zu einer verstärkten anti-tumoralen Reaktion (Aarnoudse et al., 2008). Mit Galactofuranose beschichtete Goldnanopartikel zeigten eine Bindung an DC-SIGN und induzierten proinflammatorische Reaktionen in aus Monozyten stammenden DCs (Chiodo et al., 2014).

Außerdem können C-Typ Lektine als nützliche Biomarker für Krankheiten funktionieren – beispielsweise kann der Serumspiegel des Mannose-bindenden Lektins zur Vorhersage der Anfälligkeit für Autoimmun- und Infektionskrankheiten verwendet werden (Brown et al., 2018).

Es stellt sich die Frage, wie CLRs am besten gezielt eingesetzt werden können, um die Wirksamkeit von Impfstoffen zu verbessern oder Toleranz bei Autoimmunkrankheiten zu induzieren (Kingeter and Lin, 2012).

## **1.2 Dendritische Zellen**

### **1.2.1 Funktion von DCs im Immunsystem**

DCs sind als die leistungsfähigsten professionellen antigenpräsentierenden Zellen bekannt. Sie können nicht nur die primäre Immunantwort auslösen, sondern die Immunreaktion auch herunterregulieren (Banchereau et al., 2000).

DCs sind jedoch nicht nur auf die Erkennung von Pathogenen spezialisiert, sie spielen auch für die Erhaltung der Homöostase, die Erkennung von Self-Antigenen (Selbstantigenen) und für die Toleranz der Gewebsumgebung eine bedeutende Rolle. Je nach Art des erkannten Antigens kommt es zur Immunität oder Toleranz (van Kooyk, 2008). DCs exprimieren ein Repertoire an PRRs, darunter TLRs und CLRs, die von Pathogenen

exprimierte molekulare Muster erkennen können. Abhängig von den Erregern, die von den DCs erkannt werden, differenzieren sich naive T-Zellen zu Typ1-T-Helferzellen (TH1), die Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) absondern, oder zu Typ2-T-Helferzellen (TH2), die Interleukin-4 (IL-4) produzieren (de Jong et al., 2002).

Unreife DCs sind im Körper in Haut- und Muskelgewebe positioniert, um eindringende Pathogene aufzuspüren und einzufangen. DCs haben die Fähigkeit zu in Lymphknoten wohnhafte T-Zellen zu wandern und die Differenzierung von T Helferzellen zu Effektorzell-Subpopulationen zu lenken – TH1, TH2, TH17 Effektor T Zellen gegen intra- und extrazelluläre Pathogene und Tregs (regulatorische T-Zellen), die die Toleranz gegen Selbstantigene erhalten und die übermäßige Immunantwort dämpfen (Kapsenberg, 2003). Die DC-Reifung findet während des Migrationsprozesses vom peripheren Gewebe zu den drainierenden Lymphknoten stattfindet (Mellman et al., 1998).

Durch die Diversität der C-Typ Lektine und die Verständnis ihrer Spezifität bezüglich Kohlenhydraterkennung, ist es möglich die Pathogenerkennung vieler Krankheiten zu fördern, und auch die Regulierung der Zellinteraktionen von DCs zu verbessern, was für die Immunkontrolle essentiell ist (van Kooyk, 2008).

Die anfängliche AG-Erkennung durch Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie DCs ist ausschlaggebend für die Auswahl des Typs von Effektor T-Zellen, die folglich die Immunantwort vermitteln. Rezeptoren wie CLRs und TLRs, die an der Erkennung und Aufnahme von Antigenen in DCs beteiligt sind, sind somit ausschlaggebend für eine ausgeglichene Immunantwort (Drickamer, 1999; Figdor et al., 2002).

## **1.3 DC-SIGN**

### **1.3.1 Immunregulation von DCs**

DCs spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase aufgrund ihrer herausragenden immunregulatorischen Fähigkeiten. Außerdem sind DCs Ausgangsfaktoren bei Autoimmunkrankheiten und spielen eine Schlüsselrolle bei der Immunabwehr von Krankheitserregern und Tumoren. Es ist bekannt, dass die immunregulatorische Fähigkeit der DCs eng mit der Mustererkennung und der Immunregulation der Rezeptoren auf der DC-Oberfläche zusammenhängt. Als Mitglied der CLR-

Familie ist DC-SIGN (DC-specific ICAM-3-grabbing non-integrin) wichtig für die Immunregulation von DCs. DC-SIGN wird auch als CD209 bezeichnet und wurde erstmals im Jahr 2000 von amerikanischen Wissenschaftlern entdeckt, die humane Immundefizienzviren (HIV) untersuchten. Da DC-SIGN an gp120 binden kann, die Infektion von CD4+ T-Zellen durch DCs fördert und somit zu Immunschwäche führt, wird es auch als HIV-1 gp120 bindendes C-Typ Lektin bezeichnet. Dadurch, dass es die Bindung von DCs an ICAM-3 auf der T-Zell-Oberfläche ohne Integrin, aber unter Beteiligung von Ca<sup>2+</sup> vermittelt, wird es als DC-SIGN bezeichnet. Studien zeigten, dass DC-SIGN eine wichtige Rolle bei der Migration und Adhäsion von DCs, der Entzündungsreaktion, der Aktivierung von T-Zellen, der Einleitung der Immunreaktion und dem Immune escape von Pathogenen und Tumoren spielt. Außerdem ist DC-SIGN an der DC-Regulierung der natürlichen und adaptiven Immunität beteiligt (Geijtenbeek et al., 2000b).

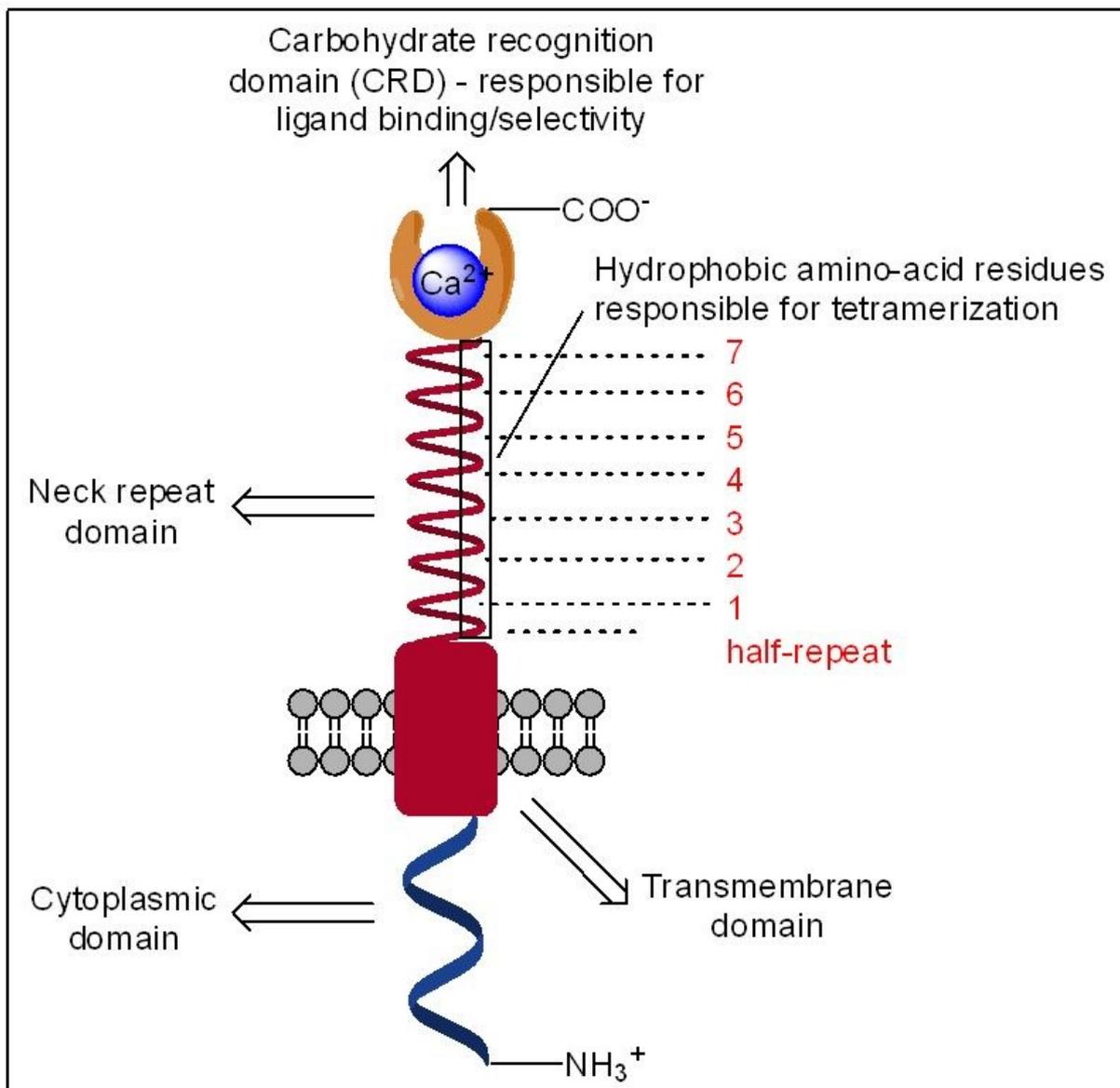
### 1.3.2 Struktur

DC-SIGN ist ein tetrameres Transmembranprotein vom Typ II, das auf verschiedenen Untergruppen von APCs, darunter Makrophagen und DCs, exprimiert wird (Engering et al., 2002).

Die Gesamtstruktur ist gekennzeichnet durch einen zytoplasmatischen Domäne, welche Internalisierungs- und Recycling-Motive enthält, die Transmembrandomäne und eine extrazelluläre Domäne (ECD) (Kwon et al., 2002).

Die ECD wiederum kann strukturell in eine flexible  $\alpha$ -helicale neck repeat Region, die mit der Tetramerisierung assoziiert ist, und die globuläre CRD unterteilt werden (Abb. 2). Als paradigmatische CLR umfasst die CRD von DC-SIGN die CTLD-Faltung mit einer Doppelschleifenstruktur, die durch zwei konservierte Disulfidbrücken, fünf  $\beta$ -Stränge, zwei  $\alpha$ -Helices und das innere WIGL-Motiv stabilisiert wird, das in DCSIGN als Trp315-Met316-Gly317-Leu318 (WMGL) dargestellt wird. Die verlängerte flexible Schleife beherbergt drei besetzte Ca<sup>2+</sup>-Stellen (I-III) und ist durch zusätzliche sekundäre Strukturelemente in Segmente unterteilt, die als lange und kurze Schleifen bezeichnet werden können. Das EPN (Glu347-Pro348-Asn349)-Motiv vermittelt die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Bindung von *High-Manose-Strukturen* und Fuc-terminierten Lewis-Typ-Antigenen (Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>) (Engering et al., 2002).

Die Monosaccharidbindung von Mannose und Fucose wird durch die Koordination des zentralen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stelle II durch die Reste, die die CBS und die benachbarten äquatorialen C3- und C4-Hydroxylgruppen am Kohlenhydratgerüst bilden, eingeleitet (Mitchell et al., 2001). Die Ligandenfreisetzung von DC-SIGN wird wahrscheinlich auch durch die Verfügbarkeit von  $\text{Ca}^{2+}$  und pH-abhängige Affinität reguliert, dies wird auch für andere CLRs so beschrieben (Ng and Weis, 1998).



**Abbildung 2: schematische Struktur von DC-SIGN:** die Gesamtstruktur lässt sich in die ECD, die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische Domäne unterteilen. Die ECD selbst besteht aus der CRD und der neck repeat Region, welche mit der Tetramerisierung assoziiert ist (Anderluh, 2012).

Einer der Hauptgründe für die Fortsetzung der Forschung im Zusammenhang mit DC-SIGN war die zunehmende Erkenntnis, dass es in der Lage ist, eine große Anzahl wichtiger Krankheitserreger zu binden. Dies ist auf seine Fähigkeit zurückzuführen, manno- und fucosehaltige Glykane zu erkennen, die auf einer Reihe von Bakterien, Parasiten, Pilzen und Viren unterschiedlich ausgeprägt sind (van Kooyk and Geijtenbeek, 2003).

### **1.3.3 Die Rolle von DC-SIGN in der Immunantwort**

Das C-Typ-Lektin DC-SIGN, das an der Aufnahme verschiedener Krankheitserreger beteiligt ist, wird von dermalen DCs sowie in Schleimhautgeweben von interstitiellen DCs in Lunge, Darm, Rektum, Gebärmutterhals und Plazenta sowie in Lymphknoten exprimiert (Geijtenbeek et al., 2000b). Wie andere Mitglieder der CLR-Familie kann DC-SIGN die Antigenpräsentationsfähigkeit von DCs vermitteln, indem es Bestandteile der Zellwand von Pathogenen oder Glykoproteine von Selbstantigenen bindet und internalisiert. Die Signaltransduktion durch diese Mustererkennung kann DCs dazu anregen, mehrere entzündungsfördernde oder entzündungshemmende Mediatoren, aktiven Sauerstoff und aktiven Stickstoff zu exprimieren, um die Expression von Co-Stimulatoren hochzuregulieren, und sogar eine erworbene Immunantwort auszulösen (Janeway and Medzhitov, 2002). Unter physiologischen Bedingungen kann die erwähnte Mustererkennung und Immunregulation die Homöostase aufrechterhalten. Unter pathologischen Bedingungen jedoch können aktivierte CLRs und TLRs die DC-Reifung und die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren stimulieren und die DC-Aktivierung bei der Immunantwort regulieren, was zu bestimmten Autoimmun- oder Entzündungskrankheiten beitragen könnte (Geijtenbeek et al., 2004). Neben der Antigenaufnahme wird DC-SIGN mit einer Vielzahl anderer physiologischer und pathophysiologischer Prozesse in Verbindung gebracht, was den Umfang des therapeutischen Potenzials erweitert (Svager et al., 2010).

Die DC-SIGN-abhängige Ausbreitung pathogener Infektionen hat in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit auf sich gezogen. DC-SIGN vermittelt die Interaktion von DCs und T-Zellen, beeinflusst die DC-Migration sowie die Immunmodulation und kann Toleranz induzieren. Die Umgehung der Immunüberwachung von Krankheitserregern oder Tumoren hängt mit der Unterdrückung von DCs durch DC-SIGN zusammen.

Das wohl bekannteste Beispiel in diesem Zusammenhang ist die Interaktion von DC-SIGN mit dem HIV-1-Hüllprotein gp120, welche zu einer Transinfektion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, den primären Wirtszellen des Virus, führt (Geijtenbeek et al., 2000b). DC-SIGN erleichtert nicht die Verarbeitung von HIV-1 durch DCs, sondern schützt das Virus vor intrazellulärem Abbau. Es gibt keine DC-SIGN und ICAM-3 Interaktion bei diesem Prozess, aber andere Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 und ICAM-1 sind daran beteiligt (Geijtenbeek et al., 2000b). Der Mechanismus der Interaktion zwischen DC-SIGN und HIV-1 bleibt unklar. Eine mögliche Erklärung könnte wie folgt lauten: Die Bindung des viralen Hüllglykoproteins an DC-SIGN könnte eine Konformationsänderung hervorrufen, die eine effizientere Interaktion mit CD4 und/oder dem Chemokinrezeptor ermöglicht. Die Bindung von DC-SIGN an gp120 könnte somit einen dieser Übergänge erleichtern oder stabilisieren. Außerdem kann die Bindung von Viruspartikeln an DC-SIGN diese an der Oberfläche der DC fokussieren oder konzentrieren und so die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass ein Eindringen erfolgt, nachdem sie an den Rezeptorkomplex auf den Zielzellen gebunden haben (Geijtenbeek et al., 2000a).

Weitere Beispiele sind andere Viren, wie das Ebola-Virus (Lin et al., 2003), das Hepatitis-C-Virus (Pöhlmann et al., 2003), das Dengue-Virus (Tassaneeritthep et al., 2003), das Cytomegalovirus (Halary et al., 2002), HIV-1, das Masernvirus (de Witte et al., 2006), das SARS-Coronavirus (Marzi et al., 2004), sowie *Mycobacterium tuberculosis* (Geijtenbeek et al., 2003), *Helicobacter pylori* (Wu et al., 2014), *Streptococcus pneumoniae* (Koppel et al., 2005), aber auch diverse Pilze, einige Parasiten und Tumore (Svajger et al., 2010). Das SARS-Coronavirus kann beispielsweise über sein glykosyliertes S-Protein an DC-SIGN binden und ist dadurch an der Entzündungsreaktion von DCs beteiligt (Marzi et al., 2004). Bakterielle Krankheitserreger schaffen es, DC-SIGN in einer Weise auszunutzen, die ihre Infektiosität und das Überleben des Wirts erhöhen, und so chronische Infektionszustände verursachen, die ein Leben lang anhalten können. Diese Krankheitserreger erreichen eine solche Umgehung des Immunsystems durch eine erfolgreiche Manipulation des TH1/TH2-Gleichgewichts, und zwar durch einen Mechanismus, an dem ihre Interaktion mit DC-SIGN beteiligt ist. DCs können eine Vielzahl von T-Zell-Effektormechanismen auslösen, die von verschiedenen Faktoren abhängen, einschließlich des Zytokinprofils, das nach der DC-Aktivierung induziert wird (Banchereau et al., 2000).

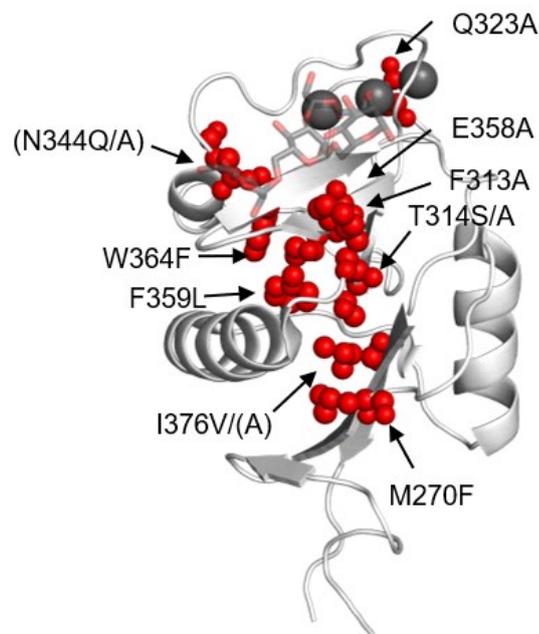
Der Mechanismus, der durch DC-SIGN vermittelten Umgehung der Immunreaktion, ist nach wie vor schlecht verstanden. Eine mögliche Erklärung könnte die Internalisierung von Antigenen oder der Crosstalk zwischen CLRs und TLRs usw. sein (Zhou et al., 2006). DC-SIGN ermöglicht aber nicht nur das Eindringen von Krankheitserregern in DCs, sondern beeinflusst nach der Bindung eines Erregers das Ergebnis der Immunantwort durch Modulation der Aktivierungswege anderer PRRs (Geijtenbeek and van Kooyk, 2003).

### 1.3.4 DC-SIGN Mutanten

CLRs sind schwierige Targets für die Entwicklung von arzneimittelähnlichen Molekülen, aufgrund der sehr hydrophilen primären Bindungsstelle. Daher kommt den sekundären Bindungsstellen eine besondere Bedeutung zu. Diese bieten die Möglichkeit, auf schwierige, hydrophile primäre Stellen abzielen, die für die traditionelle medizinische Chemie nicht geeignet sind (Aretz et al., 2018). Für CLRs ist dies von Bedeutung, weil die sekundäre Bindungsstelle die Kohlenhydratbindung potentiell allosterisch über eine erhöhte Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$  moduliert. Die Vorhersage-Softwares *AllositePro* und *PARS* sagten für DC-SIGN voraus, dass die sekundäre Bindungsstelle, sowie Teile der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stellen, einschließlich Teile der CBS, ein allosterisches Potenzial besitzen, was auf eine Verbindung zwischen der Ligation an der sekundären Stelle und der Kohlenhydratbindung an der CBS hindeutet. Bezogen auf DC-SIGN kann eine allosterische Modulation auch eine Möglichkeit für die Hemmung dieses Targets sein, und den Fokus weg von der schwierigen primären Stelle legen (Aretz et al., 2017).

Als Folge einer extern durchgeführten Molecular Dynamics-Simulation wurde eine Hypothese über das allosterische Netzwerk innerhalb von DC-SIGN aufgestellt. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die Mutanten vorgeschlagen, indem einzelne Aminosäuren an relevanten Positionen des Proteins mutiert wurden (*Abb.3*). Diese Mutationen sollen demnach Auswirkung auf die Struktur und Funktion von DC-SIGN haben. In dieser Arbeit wurde mit den Mutanten E358A, F313A, F359L, I376A, I376V, N344A, N344Q, Q323A, T314A, T314S und W364F gearbeitet. Die Zahl gibt die Position der Aminosäure in der Sequenz des Proteins an, die Aminosäure vor der Zahl wurde durch jene nach der Zahl ersetzt.

Besonders interessant sind mögliche, durch Mutationen hervorgerufene, Veränderung im Hinblick auf die Allosterie. Kommt es durch diese Abänderungen in der Aminosäuresequenz zu einer Modulierung der allosterischen Bindungsstelle (= secondary binding site), kann dies Auswirkungen auf die primäre Bindungsstelle, Konformationsänderung, und Bindungsaffinitäten haben. Die Bedeutung von sekundären Bindungsstellen darf daher nicht unterschätzt werden, einerseits aufgrund der Rolle bei der Bestimmung der Kohlenhydratspezifität, aber auch für das Design von Arzneimittel mit Schwerpunkt auf Lektinen generell (Ernst and Magnani, 2009).



**Abbildung 3: Position der Mutationen in DC-SIGN:** Die Positionen der verschiedenen Mutationen innerhalb der Struktur von DC-SIGN werden in dieser Grafik aufgeschlüsselt und es wird ersichtlich in welchem Teil der Sekundärstruktur sie sich befinden. Für die DC-SIGN Mutanten wurden Aminosäuren in allen Bereichen des Proteins mutiert.

## 1.4 Bakterielle Expression rekombinanter Proteine

### 1.4.1 Vorteile bakterieller Expressionssysteme

Bakterielle Systeme sind für die Herstellung rekombinanter Proteine aufgrund der niedrigen Kosten, der hohen Produktivität und des schnellen Einsatzes sehr attraktiv. Entscheidend für die Herstellung eines bestimmten Proteins ist die Wahl des geeigneten Promotorsystems und Wirts (Terpe, 2006).

Die Herstellung rekombinanter Proteine in hoch gereinigter und gut charakterisierter Form ist zu einer wichtigen Aufgabe für den Proteinchemiker in der pharmazeutischen Industrie geworden. Bakterielle Expressionssysteme werden insofern äußerst gerne verwendet, da sie schnell und in hoher Dichte auf kostengünstigen Substraten wachsen können, ihre Genetik oft gut charakterisiert ist und eine wachsende Zahl von Klonierungsvektoren und mutierten Wirtsstämmen zur Verfügung steht. Um hohe Proteinmengen zu produzieren, ist es oft nützlich, das Gen nach einem gut charakterisierten, regulierten Promotor zu klonieren. Die Wahl des Wirts- und Promotorsystem hängt oft vom Zielprotein selbst ab. Viele bakterielle Systeme sind jedoch nicht in der Lage, Proteine posttranslational zu modifizieren, zum Beispiel durch Glykosylierung. Wenn die posttranslationale Modifikation für die Bioaktivität wesentlich ist, sollten diese daher nicht verwendet werden. Für diese Anwendung stehen alternative Wirte wie Hefen, filamentöse Pilze oder Zellkulturen von Insekten und Säugetieren zur Verfügung (Schmidt, 2004).

### 1.4.2 Escherichia coli als Wirt

Das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) ist der am häufigsten verwendete Organismus für die heterologe Proteinproduktion. Einer der Gründe dafür ist, dass dieser Organismus sehr bekannt und in jedem Labor etabliert ist. Es überrascht daher nicht, dass *E. coli*-Systeme auch am häufigsten für die industrielle und pharmazeutische Proteinproduktion verwendet werden und die Produktion in großem Maßstab etabliert ist. Ein Nachteil für den therapeutischen Einsatz rekombinanter Proteine, die in *E. coli*

hergestellt werden, ist jedoch die Anhäufung von Lipopolysacchariden (LPS), allgemein als Endotoxine bezeichnet, die bei Menschen und anderen Säugetieren pyrogen wirken. Deshalb müssen Proteine für diese Anwendung in einem zweiten Schritt gereinigt werden, um endotoxinfrei zu werden (Petsch, 2000). Im Allgemeinen reichern sich überexprimierte rekombinante Proteine entweder im Zytoplasma oder im periplasmatischen Raum an, wobei das Zytoplasma meist die erste Wahl für die Produktion ist, da mit höherer Ausbeute zu rechnen ist. Außerdem ist die bemerkenswerte Ausbeute an sekretierten Proteinen gut dokumentiert (Georgiou and Segatori, 2005). Am häufigsten werden für die routinemäßige Expression die Stämme *E. coli* BL21 und K12, sowie deren Derivate verwendet.

Die Überexpression eines Gens in einem fremden Wirt führte häufig zu einer Vielzahl unerwünschter Probleme, von denen die meisten das Ergebnis der unterschiedlichen Verwendung von Codons zwischen *E. coli* und dem überexprimierten Protein sind. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Aminosäuren durch mehr als ein Codon kodiert werden, und jeder Organismus seine eigene Tendenz bei der Verwendung der 61 verfügbaren Aminosäurecodons hat. In jeder Zelle spiegelt die tRNA-Population die Codon-Verwendung der mRNA-Population genau wider (Dong et al., 1996). Unterschiede in der Codon-Nutzung können die Translation behindern, weil eine oder mehrere tRNAs benötigt werden, die im Expressionswirt selten sind oder fehlen (Kane, 1995). Unzureichende tRNA-Pools können zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation oder einem falschen Einbau von Aminosäuren führen (Kurland and Gallant, 1996). Um die Expression von eukaryotischen Proteinen oder von Proteinen, die in *E. coli* selten verwendeten Codons enthalten, zu verbessern, wurden daher viele *E. coli*-Stämme zur Lösung dieses Problems entwickelt. Diese Stämme liefern zusätzliche tRNAs unter der Kontrolle ihrer nativen Promotoren. Unabhängig von Wirt und Promotorsystem können Plasmide mit niedriger, mittlerer und hoher Kopienzahl verwendet werden, um Expressionsprobleme aufgrund eines unzureichenden Expressionsniveaus zu verringern. So können beispielsweise Vektoren mit niedriger Kopienzahl benutzt werden, wenn Vektoren mit hoher Kopienzahl nicht verwendet werden können, weil große Mengen des rekombinanten Proteins toxisch sind (Terpe, 2006).

Ein weiterer Nachteil der Überexpression im Zytoplasma ist, dass viele Proteine Einschlusskörper bilden. Strategien zur Lösung dieses Problems könnten Temperatursenkung, Substitution von Aminosäuren, Co-Expression von Chaperonen, hydrophile große Fusionspartner, die Zugabe von Sorbit, Glycylbetain, Saccharose oder Raffinose in das Wachstumsmedium, Änderung der Kulturbedingungen wie des pH-Werts, oder die Änderung des Bakterienstamms sein (Hockney, 1994). Eine weitere Alternative stellt die Solubilisierung der Einschlusskörper dar, die anschließend neu gefaltet werden müssen, um funktionelle und aktive Produkte zu erhalten (Singh and Panda, 2005).

Ein nützlicher Promotor muss stark sein, ein niedriges Basalexpressionsniveau aufweisen, also streng reguliert sein, leicht auf andere *E. coli*-Stämme übertragbar sein. Die Induktion muss einfach und kostengünstig sein und sollte unabhängig von den üblicherweise verwendeten Bestandteilen der Kulturmedien sein. Einige bekannte Systeme sind Lactose- (*lac*), *tac*- und *trc*-Promotoren. Die Laktoseverwertung in *E. coli* ist einer der bekanntesten Regulationsmechanismen. Viele Promotoren wurden aus einem von *lac* abgeleiteten regulatorischen Element konstruiert (Polisky et al., 1976). Der *lac*-Promotor ist eher schwach und wird nur selten für die Produktion rekombinanter Proteine auf hohem Niveau verwendet. Die Induktion dieser Promotoren kann durch Zugabe des nicht hydrolysierbaren Laktoseanalogons Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) erreicht werden (Terpe, 2006).

### **1.4.3 Andere bakterielle Wirte als *E. coli***

Viele Proteine können jedoch nicht in *E. coli* exprimiert werden. In solchen Fällen können andere bakterielle Wirte wie *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* oder das gramnegative Bakterium *Caulobacter crescentus* eine interessante Alternative darstellen. Ein Grund dafür ist auch, dass die zunehmende Kenntnis der Genomik es ermöglicht, die Codon-Nutzung von Wirts- und Ursprungsorganismus zu vergleichen. Ein Wirt mit einer ähnlichen Codon-Verwendung ist optimal.

Nach *E. coli* scheinen gram-positive *Bacillus*-Stämme der beliebteste Organismus für die heterologe Proteinproduktion zu sein. Viele pharmazeutisch relevante Proteine wurden bereits erfolgreich in verschiedenen Stämmen exprimiert. Im Gegensatz zu den bekannten *E. coli* haben *Bacilli*-Stämme den allgemeinen Vorteil, dass die äußere Membran keine Lipopolysaccharide enthält. Einen weiteren Vorteil bringt die von Natur aus hohe

Sekretionskapazität mit sich, sowie die direkte Abgabe der Proteine direkt in das extrazelluläre Medium (Westers et al., 2004).

#### **1.4.4 Affinität-Tags zur Aufreinigung rekombinanter Proteine**

Um die Solubilisierung markierter Proteine zu erleichtern und die Aufreinigung rekombinanter Proteine zu vereinfachen, wurde eine Vielzahl von Fusion-Tags entwickelt (Kaur et al., 2018). Fusions-Tags erhöhen das Expressionsniveau und/oder die Löslichkeit von Proteinen. Diese Tags können aus Proteinen oder Peptiden bestehen, die mit Zielproteinen verknüpft sind, und sie tragen dazu bei, dass eine natürliche Faltung erreicht wird, die zu einer angemessenen funktionellen Aktivität führt, oder eine höhere Konzentration eines schlecht exprimierten Proteins erzielt wird. Affinitäts-Tags werden zusammen mit dem entsprechenden affinitätsbindenden Liganden verwendet, um eine schnelle und effiziente Aufreinigung von Proteinen zu ermöglichen, was wiederum zu einer höheren Produktionsausbeute des exprimierten Proteins führt (Malhotra, 2009).

Affinitätsmarkierungen werden außerdem für die einstufige Reinigung von rekombinantem Protein aus dem Gesamtproteinpool der Wirtszellen verwendet. Neben dem Kombinationsprotein produziert das Wirtszellsystem auch große Mengen an Stoffwechselproteinen, so dass die Gewinnung von rekombinantem Protein aus der biologischen Rohquelle durch die Expression von affinitätsmarkiertem Protein erreicht wird. Dazu gehören Poly-Histidin-Tag (His-Tag), Chitinbindungsprotein (CBP), Maltosebindungsprotein (MBP) und Glutathion-S-Transferase (GST) (Kaur et al., 2018).

Bei der Expression in Kombination mit löslichen Fusions-Tags und Affinitäts-Tags, wie zum Beispiel dem Hexahistidin-Tag für die Aufreinigung, ist das Vorhandensein von Fusions-Tags unerwünscht, da sie möglicherweise die biologische Funktion beeinträchtigen und die ordnungsgemäße Strukturanalyse oder Immunogenität stören können. Daher ist die Entfernung des Fusions-Tags ein notwendiger Schritt im nachgeschalteten Prozess. Die Entfernung kann durch Hinzufügen einer Protease-Erkennungssequenz zwischen dem Fusions-Tag und dem Zielprotein erfolgen, so dass das Tag bei Bedarf durch eine Protease entfernt werden kann (Costa et al., 2014).

Das bereits erwähnte Poly-His-Tag ist ein weit verbreitetes Protein-Tag, welches an eine Metallmatrix bindet. Die Anzahl der Aminosäurereste variiert zwischen drei und zehn. Der Hexahistidin-Tag bietet mehrere Vorteile, wie eine geringe Größe, die Struk-

tur und Funktion des Proteins kaum beeinträchtigt, sowie keine elektrische Ladung, geringe Toxizität und Immunogenität, und ermöglicht die Verwendung unter nativen und denaturierenden Bedingungen (Zhao et al., 2013). Das Zielprotein kann unter milden Bedingungen durch Konkurrieren mit Imidazol oder niedrigem pH-Wert eluiert werden. Viele Proteine funktionieren mit dem Poly-His-Tag sowohl am N-, als auch am C-Terminus. Zur Reinigung rekombinanter Proteine mit diesem Tag wird immobilized metal-affinity chromatography (IMAC) verwendet, um die metallbindenden Peptide auf der Grundlage der Wechselwirkung zwischen dem negativ geladenen His und den auf einer Matrix immobilisierten Metallionen (wie  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ ) zu isolieren (Chaga, 2001). Häufig verwendete IMAC-Harze wie Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA) oder Carboxymethyl-Aspartat-Agarose haben eine hohe Bindungskapazität und können für die Reinigung von Fusionsproteinen direkt aus rohen Zelllysaten verwendet werden (Terpe, 2006). Der His-Tag ist auch ein nützliches Werkzeug bei der Proteinkristallisation und dem Nachweis von Proteinen (Carson et al., 2007).

Weitere häufig verwendete Tags sind neben dem His-Tag, MBP und GST (Harper and Speicher, 2011) auch N-utilization substance A (Costa et al., 2013), Thioredoxin (Savitsky et al., 2010) und small ubiquitin-related modifier. Sie gehören zur Gruppe der Proteinfusions-Tags. Außerdem gibt es noch kurze Peptidfusions-Tags, deren Vorteil es ist, dass die Aminosäuresequenz in der Regel 15 Reste oder weniger beträgt, was die Proteinstruktur nicht ernsthaft beeinträchtigt oder die Aktivität des Proteins beeinträchtigt, wenn es an das gewünschte Protein fusioniert wird (Carson et al., 2007). Daher ist es möglicherweise nicht notwendig, die Fusions-Tags für die Anwendung von Proteinen zu entfernen, die keine therapeutischen Proteine sind, im Gegensatz zum Fall eines Protein-Fusions-Tags. Kurze Peptid-Tags können auch die metabolische Belastung des Wirts durch die Proteinexpression im Vergleich zu großformatigen Tags verringern (Zhao et al., 2013).

#### **1.4.5 Rückfaltung der Proteine**

Um das Protein in seiner funktionsfähigen, bioaktiven Form rückzugewinnen, ist es notwendig, die Rückfaltung durchzuführen. Proteine können in vitro durch Verringerung der Konzentration von Denaturierungsmitteln mit verschiedenen Methoden rückgefaltet werden. Die größten Herausforderungen bei der Rückfaltung von Proteinen aus einem

denaturierten Zustand sind die Bildung von Proteinaggregaten beziehungsweise von fehlgefalteten Proteinen. Für eine effiziente Proteinrückfaltung sind folgende Faktoren von entscheidender Bedeutung: die Wahl des Lösungsvermittlers, die Konzentration des Proteins während der Rückfaltung, die Rückfaltungsbedingungen (niedermolekulare Zusätze, pH-Wert und Temperatur) im Rückfaltungspuffer und die Wahl der verwendeten Methode (Singhvi et al., 2020). Da die Proteinaggregation bei hohen Proteinkonzentrationen begünstigt wird, wird zur Vermeidung einer Aggregation die Rückfaltung in der Regel in stark verdünnten Konzentrationen (10-100 µg/mL) durchgeführt. Dialyse und Verdünnung sind die im Labormaßstab am häufigsten praktizierten Rückfaltungsmethoden (Ryś et al., 2015). Die Rückfaltung durch Verdünnung kann schnell oder langsam erfolgen. Bei der schnellen Verdünnung nimmt die Konzentration des Proteins und des Denaturierungsmittels drastisch ab, wenn das gelöste Protein in den Rückfaltungspuffer überführt wird (Nishiyama et al., 2003). Allerdings kann dies für Proteine, die eine längere Zeit für die Rückfaltung in den nativen Zustand benötigen, von Nachteil sein. Daher ist die langsame Verdünnung die alternative Methode, da sie ein schonenderes Verfahren ist. Die „pulsed dilution“ oder „pulse renaturation“ beinhaltet die sehr langsame Zugabe von solubilisiertem Protein zum Rückfaltungspuffer und wird ebenso erfolgreich angewandt (Vallejo and Rinas, 2004). Eine weitere Methode ist die Dialyse, bei der das konzentrierte, denaturierte Protein gegen den Rückfaltungspuffer dialysiert wird, so dass die Rückfaltung aufgrund der langsamen Entfernung des Denaturierungsmittels erfolgt. Alternativ kann, wenn andere Methoden versagen, die Rückfaltung über eine Säule durchgeführt werden. Dafür wird das Protein auf der Affinitätssäule immobilisiert und durch Verringern der Denaturierungsmittelkonzentration rückgefaltet. Das gefaltete Protein wird schließlich eluiert (D’Alatri et al., 1998). Für die Renaturierung von Proteinen mit nativen Disulfidbindungen ist ein Redoxsystem erforderlich. Die Kombination von reduzierten und oxidierten Formen von Redoxmitteln wird in Molverhältnissen von 1:1 bis 10:1 verwendet, zum Beispiel Glutathion (GSH/GSSG), DTT/oxidiertes Glutathion, Cystein/Cystin (Chakravarthi et al., 2006). Es gibt keinen universellen Rückfaltungspuffer, da sich jedes Protein in einigen Aspekten von anderen unterscheidet. Daher ist es notwendig, die Rückfaltungsbedingungen für jedes Protein zu überprüfen. Die Verwendung von Zusatzstoffen kann die korrekte Rückfaltung des

Proteins begünstigen. Beispiele für Zusatzstoffe sind Aceton, Acetoamid, Harnstoff, Zucker, DMSO und Polyethylenglykol (Yasuda et al., 1998).

#### **1.4.6 Aufreinigung rekombinanter Proteine**

##### **Affinitätschromatographie:**

Die Affinitätschromatographie ist eine selektive und vielseitige Form der Flüssigkeitschromatographie, die auf der reversiblen und spezifischen Bindung zwischen einem Protein und seinem Liganden beruht (Ayyar et al., 2012). Darunter fallen beispielsweise die Bindung eines Hormons an seinen Rezeptor, die Wechselwirkung zwischen Enzym und seinem Substrat, sowie die Bindung eines Antikörpers an sein Zielantigen. Diese Spezifität der Wechselwirkung wird bei der Affinitätschromatographie genutzt, indem einer der wechselwirkenden Stoffe, der so genannte Affinitätsligand, auf der Säule als Träger der stationären Phase immobilisiert wird. Das Zielprotein wird durch selektive Absorption an dem Affinitätsliganden aus einem komplexen Gemisch eluiert. Das komplexe Gemisch, das das Zielprotein enthält, wird in eine mobile Phase eingebracht, die die richtige Zusammensetzung und den richtigen pH-Wert für die Bindung des Zielproteins an den Affinitätsliganden aufweist, während andere Komponenten durchgelassen werden. Das zurückgehaltene Target wird dann von der Säule eluiert. Die Methode der Wahl für die Elution des Targets hängt von der Affinität der Interaktion zwischen Target und Ligand ab. Nach der Elution lässt man die Säule regenerieren, bevor die nächste Probe aufgetragen wird (Arora et al., 2017).

Eine Voraussetzung für die Affinitätschromatographie ist ein Trägersystem für die Liganden und Targets. Zu den gewünschten Eigenschaften, die von diesen Trägermaterialien erwartet wurden, gehörten ein Minimum an unspezifischer Absorption, Unlöslichkeit in dem verwendeten Puffersystem, Anpassungsfähigkeit an die entsprechenden Fließeigenschaften, Verfügbarkeit einer angemessenen Oberfläche und einfache Aktivierung für die Kopplung des Liganden. Darüber hinaus sollten sie gleichmäßig in einer Säule verteilbar sein, Makroporosität und Hydrophilie aufweisen und stabil genug sein, um verschiedenen chemischen und mechanischen Beanspruchungen standzuhalten. Je nach Herkunft der Verbindungen wurden die für die Affinitätschromatografie verwendeten Matrices in drei Klassen eingeteilt: natürliche, synthetische und anorganische. Zu den Trägerarten zählen zum Beispiel Polystyrol, Agarose, Cellulose und Siliziumdioxid.

Diese chromatographischen Matrizes können auf Säulen verwendet werden, jedoch sind die relativ hohen Kosten und der hohe Druckabfall entlang der Säule bei bestimmten Anwendungen nicht erwünscht. Daher wurde mit der Entwicklung von Affinitätsmembranen eine alternative Methode für die Bioseparation großer Proteine eingesetzt. Affinitätsmembranen bieten verbesserte Massentransfereffizienzen, einfache Handhabung, Makroporosität, größere Oberfläche und höhere dynamische Bindungskapazität (Teeters et al., 2003).

Die Affinitätsliganden sind der Hauptbestandteil eines erfolgreichen affinitätschromatographischen Aufbaus (Hage et al., 2012). Zu den typischen Eigenschaften eines geeigneten Liganden für die Affinitätschromatographie gehören die Affinität zum Target, die Spezifität, die Immobilisierbarkeit, die Stabilität unter rauen Wasch- und Elutionsbedingungen und die Beibehaltung der Target-Bindungskapazität nach der Bindung an die Matrix. Ein spezielles Verfahren ist die IMAC (Arora et al., 2017).

#### **Immobilized metal ion affinity chromatography:**

IMAC ist ein häufig genutztes Verfahren für die Proteinaufreinigung, das auf der Affinität von Übergangsmetallionen wie  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , und  $\text{Co}^{2+}$  zu den Aminosäuren Cystein, Histidin und Tryptophan in wässrigen Lösungen basiert. Die Anwendung dieser Metallionen wurde schließlich, durch deren Immobilisierung auf einen Träger, zur Fraktionierung und Reinigung von Proteinen in Lösungen ausgedehnt (Porath et al., 1975). Jene Aminosäurereste sind auf der Proteinoberfläche exponiert, und über sie binden Proteine spezifisch an die Koordinationsstellen der Metallionen. Die bekannteste Anwendung ist die Reinigung von Fusionsproteinen mit einem His-Tag. Diese Technik hat sich zu einem wichtigen Instrument für die Reinigung von Proteinen entwickelt, vom Labormaßstab bis hin zum industriellen Maßstab. Das bei der IMAC verwendete chromatographische Sorptionsmittel besteht aus einem Träger, an den ein chelatbildender Ligand über einen Linker gebunden ist. Elektronendonatoratome (N, S und O) in den Chelatbildnern, die an den chromatographischen Träger gebunden sind, können die zugegebenen Metallionen koordinieren und Metallchelate bilden. Einige Koordinationsstellen der Metallionen bleiben frei für die Bindung an Lösungsmittel oder Protein (Kågedal, 2011).

Die Elution des Zielproteins kann durch die Verwendung eines Puffers mit niedrigem pH-Wert, eines kompetitiven Verdrängungsmittels oder eines Chelatbildners erreicht werden. Häufig werden Elutionspuffer mit einem niedrigen pH-Wert, zum Beispiel pH

4,0, verwendet. Der pKa-Wert des Imidazolrings des Histidinrests beträgt etwa 6,0, und das Imidazol wird protoniert, wenn der pH-Wert auf etwa 4,0 gesenkt wird. Unter dieser Bedingung bindet der protonierte Imidazolring nicht an die Metallionen und wird dann eluiert. Die kompetitive Verdrängung mit Imidazol bei annähernd neutralem pH-Wert ist für Proteine, die empfindlich auf einen niedrigen pH-Wert reagieren, besser geeignet. Die Einführung eines starken Chelatbildners wie EDTA erleichtert die Elution der Zielproteine. EDTA extrahiert die Metallionen und unterbricht die Wechselwirkung zwischen Proteinen und Chelatliganden. Daher muss die Säule vor der nächsten Reinigung erneut mit Metallionen aufgeladen werden der nächsten Aufreinigung erforderlich (Chaga, 2001).

Es wurde eine Vielzahl von IMAC-Trägern mit unterschiedlichen Vorzügen und Einschränkungen entwickelt. Traditionelle Träger basieren auf einer Weichgelmatrix wie Agarose. Polysaccharide wie Cellulose haben den Vorteil der biologischen Verträglichkeit und der leichten Aktivierung. Sie weisen jedoch eine geringe mechanische Festigkeit auf und können daher nicht in Hochdrucksystemen verwendet werden. Anorganische Träger, wie Siliziumdioxid haben dagegen hervorragende mechanische Eigenschaften, leiden aber unter dem Nachteil der irreversiblen unspezifischen Adsorption von Proteinen (Cheung et al., 2012).

Die Wahl des auf der IMAC-Matrix immobilisierten Metallions hängt von der Anwendung ab. Zweiwertige Ionen wie  $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Ni}^{2+}$ -,  $\text{Zn}^{2+}$ - und  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen werden für die Aufreinigung von Histidin-markierten Proteinen verwendet (Borrebaeck et al., 1981). Die Kompatibilität von IMAC-Matrizen mit einer Vielzahl von Chemikalien wie Chaotropika, Salzen, organischen Lösungsmitteln, Detergenzien und Reduktionsmitteln erleichtert die Anpassung an die spezifischen Anforderungen der Reinigung einzelner Proteine. Es ist gängige Praxis, Natriumchlorid (0,3 - 1,0 M) in Puffer für die IMAC zu geben, um die ionische Wechselwirkung zwischen den Proteinen und dem Harz zu minimieren (Lønnerdal et al., 1977). Glycerin (bis zu 50 %) oder Ethanol (bis zu 20 %) können dem Puffer hinzugefügt werden, um hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Proteinen zu verhindern (Esfandiar et al., 2010).

Außerdem wird normalerweise ein Ladepuffer mit einem leicht alkalischen pH-Wert verwendet. Der Grund dafür ist, dass die Elektronendonorguppen auf der Proteinoberfläche in diesem pH-Bereich unprotoniert sind und die Bindung erleichtern. Die Bindung

an andere funktionelle Aminogruppen auf der Proteinoberfläche wird in einem alkalischeren Bereich begünstigt, was die Selektivität verringert. Am häufigsten werden Phosphat- und Acetatpuffer verwendet, da sie nicht an die Koordinationsstellen des chelatierten Metallions binden (Wong et al., 1991).

Im *E. coli*-System kommt es häufig zu einer fehlerhaften Proteinexpression. Aufgrund von Fehlern bei der Initiierung der Translation, vorzeitiger Beendigung der Proteinsynthese oder durch falsche Faltung und anschließendem Abbau des fehlgefalteten Proteins durch Proteasen des Wirts können Varianten des Zielproteins entstehen. Da diese verkürzten Proteine viele Eigenschaften mit dem Zielprotein gemeinsam haben, ergeben sich Probleme bei der chromatographischen Abtrennung dieser Proteine vom Zielprotein. Dies führt zu einer Verunreinigung des Endprodukts. Diese Probleme können durch das Einfügen eines Histidin-Tags an den N- bzw. C-Terminus des Zielproteins gelöst werden. Kontaminierte Proteine ohne Histidin-Tag binden nämlich nicht an das IMAC-Harz und können daher von den korrekt exprimierten Zielproteinen getrennt werden (Jones et al., 1995).

Durch die Verwendung eines an das Zielprotein fusionierten Histidin-Tags kann das Protein unter denaturierenden Bedingungen in einem einzigen Chromatographieschritt gereinigt werden. Die hohe Selektivität der Bindung zwischen dem mit Histidin markierten Protein und dem IMAC-Harz und die Tatsache, dass bakterielle Proteine keine Metallaffinität aufweisen, sind der Grund für den geringen Grad der Kontamination mit bakteriellen Proteinen (Sawadogo and Van Dyke, 1995). IMAC funktioniert gut bei einem pH-Wert von 5 (Andersson and Porath, 1986) bis 8,5 (Coppenhaver, 1986). Die Metallionen lassen sich leicht vom Harz ablösen, so dass eine Vielzahl von Metallionen auf demselben Harz getestet werden kann, um die für die Reinigung des Zielproteins optimalen Metallionen zu ermitteln. Das Up-Scaling von IMAC ist relativ einfach und reproduzierbar, sogar für industrielle Anwendungen (Porath, 1992). Kleine Proteine können oft nicht mit der Immunaффinitätschromatographie gereinigt werden, da es nicht einfach ist, Antikörper gegen kleine Proteine zu züchten. Die IMAC ist jedoch für kleine Proteine geeignet, die eine Affinität zu Metallionen aufweisen. Der Histidin-Tag kann bei der Mehrzahl der Proteine durch Rekombinationstechnik leicht eingebaut werden. Alle mit Histidin markierten Proteine können mit IMAC gereinigt werden, so dass keine individuellen Downstream-Prozesse entwickelt werden müssen. Da die Proteinreinigung mittels

IMAC auf der Affinität von Proteinen zu Metallionen beruht, kann diese Methode nicht für Proteine ohne Metallaffinität verwendet werden. Chelatbildner wie EDTA, die die Metallionen vom Harz ablösen, müssen vermieden werden. Vorsicht ist auch bei der Verwendung anderer potenziell chelatbildender Gruppen geboten.

In Summe lässt sich sagen, dass IMAC ein sehr leistungsfähiges Verfahren ist, da es eine Verringerung der Anzahl der Schritte im Reinigungsverfahren ermöglicht und Produkte von wünschenswerter Qualität und hoher Reinheit liefert (Cheung et al., 2012).

### **Size-exclusion chromatography (SEC):**

Ein weiteres prominentes Verfahren der Flüssigkeitschromatographie ist die SEC, welche die Auftrennung nach Molekulargewicht ermöglicht. Die Trennung bei der SEC basiert auf dem teilweisen Ausschluss von Polymermolekülen aus den Poren der stationären Phase (Striegel, 2009). Die Isolierung durch SEC basiert insbesondere auf dem unterschiedlichen Elutionsverhalten von Partikeln unterschiedlicher Größe, die durch ein poröses Polymer, das die stationäre Phase bildet - auch als Gel-Filtrationsmatrix oder Harz bezeichnet - und durch die mobile Phase der SEC-Säule getragen werden (Monguió-Tortajada et al., 2019).

Im Gegensatz zu Techniken wie Ionenaustausch- (IEX) oder Affinitätschromatographie (AC) binden die Moleküle nicht an das Harz, was bedeutet, dass die Pufferzusammensetzung keinen direkten Einfluss auf die Auflösung hat. Daher können die Bedingungen je nach Art der Probe oder den Anforderungen für die weitere Reinigung, Analyse oder Lagerung variiert werden, was einen wesentlichen Vorteil mit sich bringt. Durch ihre Vielseitigkeit eignet sich die SEC gut für Biomoleküle, die empfindlich auf Änderungen des pH-Werts, der Konzentration von Metallionen oder Cofaktoren oder auf raue Umweltbedingungen reagieren. Zusätzlich lässt sich die SEC in einem breiten Temperaturbereich durchführen, somit lassen sich die Anforderungen der meisten Experimente abdecken.

Um eine Trennung durchzuführen, wird das Harz, welches aus einer porösen Matrix aus chemisch und physikalisch stabilen kugelförmigen Partikeln besteht, in eine Säule gepackt. Die Partikel weisen Eigenschaften auf, die die Adsorption von Biomolekülen minimieren. Mit einem Puffer, der die Poren der Matrix und den Raum zwischen den Partikeln füllt, wird die Säule ins Gleichgewicht gebracht. Die Flüssigkeit innerhalb der Poren, die stationäre Phase, befindet sich im Gleichgewicht mit der Flüssigkeit - Puffer

oder mobile Phase - außerhalb der Partikel. Die Probenkomponenten werden isokratisch eluiert, das heißt die Pufferzusammensetzung bleibt während der gesamten Trennung konstant. Während der Trennung ist es nicht notwendig verschiedene Puffer zu verwenden, jedoch wird am Ende oft ein Waschschrift mit dem Laufpuffer durchgeführt, um Moleküle zu entfernen, die möglicherweise auf der Säule zurückgehalten wurden, und um die Säule für einen neuen Lauf vorzubereiten. SEC kann direkt nach anderen Verfahren wie IEX oder AC durchgeführt werden, da die Pufferzusammensetzung im Allgemeinen keinen Einfluss auf die endgültige Trennung hat.

Die Ergebnisse der SEC werden in der Regel in Form eines Chromatogramms dargestellt, welches die Konzentrationsschwankungen der Probenbestandteile beim Eluieren von der Säule in der Reihenfolge ihrer Molekülgröße zeigt. Kleine Moleküle können in die meisten Poren eindringen, haben dadurch eine längere Aufenthaltszeit in der Säule, und eluieren am Ende des Chromatogramms. Größere Moleküle können nicht in alle Poren eindringen und passieren die Säule schneller. Makromoleküle, die zu groß sind, um in Poren einzudringen, eluieren an der Ausschlussgrenze der Säule (Uliyanchenko, 2014).

### **Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC):**

Die FPLC ist eine Form der Chromatographie, die für die Aufreinigung von Proteinen mit hoher Auflösung und Reproduzierbarkeit entwickelt wurde. Die stationäre Phase besteht aus Kügelchen mit kleinem Durchmesser - in der Regel vernetzte Agarose - die in Glas- oder Kunststoffsäulen gepackt sind und eine hohe Ladekapazität haben. Je nach Anwendung kann aus einer Vielzahl von Harzen gewählt werden, die in unterschiedlichsten Partikelgrößen und Ligandenoberflächen zur Verfügung stehen. Neben einer breiten Palette von wässrigen Puffern, welche die mobile Phase darstellen, können auch zahlreiche stationäre Phasen für die wichtigsten chromatographischen Verfahren verwendet werden. Hierzu zählen beispielsweise Ionenaustausch-, Gelfiltration- und Affinitätschromatographie. Im Allgemeinen wird die Durchflussrate der mobilen Phase mit einer, normalerweise konstant gehaltenen, Pumpe gesteuert. Die Zusammensetzung des Puffers kann durch Mischen zweier oder mehrerer Lösungen in externen Behältern jedoch variieren. Im Gegensatz zur Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) ist der verwendete Pufferdruck niedrig, typischerweise bei 5 bar, dafür ist aber die Durchflussrate hoch, zum Beispiel 1 – 5 mL/min. Die FPLC ermöglicht, die Analyse

von Proben, die Milligramm an Proteinen in 5 mL-Säulen enthalten, bis hin zur präparativen Herstellung von Kilogramm gereinigter Proteine mit Säulen mit einem Volumen von mehreren Litern (Pontis, 2017). Mit der FPLC können zahlreiche Parameter wie UV-Absorption, pH-Wert und elektrischer Leitwert gleichzeitig überwacht werden. Zusätzlich können mehrere Säulen im Tandembetrieb eingesetzt werden, was die für die Gewinnung reiner Proteine benötigte Zeit minimiert. Die Entwicklung einer erfolgreichen Reinigungsstrategie setzt voraus, dass der Benutzer die molekularen Details seines Zielproteins kennt, um die individuellen Eigenschaften des Proteins wie Molekulargewicht, Ladung oder Hydrophobizität zu nutzen (Robinson et al., 2017).

## **1.5 Ziele der Arbeit**

Hauptaugenmerk dieser Arbeit galt der Integration eines Autosamplers in das System der FPLC, um die Aufreinigung von mehreren, verschiedenen Proteinen hintereinander in einem Vorgang gewährleisten zu können und somit diesen Arbeitsschritt im Laboralltag zu vereinfachen und verbessern. Dies war insofern von Bedeutung, da ein weiterer Aspekt dieser Arbeit die Expression und Aufreinigung von DC-SIGN ECD und CRD WT und deren Mutanten war. Aufgrund der Durchführung von NMR-Experimenten und funktionalen Assays musste eine ausreichende Proteinmenge zur Verfügung gestellt werden. Die Assays wurden durchgeführt, um die Mutanten mit dem WT vergleichen zu können.

## 2 Materialien & Methoden

### 2.1 Proteinexpression und -aufreinigung

#### 2.1.1 DC-SIGN ECD Wildtyp (WT) + Mutanten

Zuerst wurde eine Vorkultur erstellt. Für 1 L Kultur wurde 1 ml des Glycerol Stock der *E.coli*-BL21-Bakterien mit dem entsprechendem Plasmid (pET30b, DC-SIGN ECD, Aminosäuren 64-404, mit CRD und neck domains) in 50 mL Luria-Bertani (LB) Medium zusammen mit 35 µg/mL Kanamycin vereint und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert.

Während die Vorkultur 15 min bei 4000 x g zentrifugiert wurde, wurde 1 L LB Medium mit 35 µg/mL Kanamycin versetzt. Das Pellet wurde nach der Zentrifugation darin resuspendiert und bei 37°C und 160 rpm inkubiert, bis ein OD<sub>600</sub> von ~0.9 erreicht wurde (IMPLEM NanoPhotometer). Anschließend erfolgte die Induktion mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), 4 h lang bei 37°C und 140 rpm. Schließlich wurden die Bakterien durch 30 min Zentrifugation bei 4000 x g und 4°C geerntet, die erhaltenen Pellets wurden in ~20-30 mL Lysis Puffer resuspendiert und über Nacht bei -20°C gelagert.

Am nächsten Tag wurde nach dem Auftauen mit Lyse-Puffer auf ~300 mL aufgefüllt und 4 mg Lysozym und 500 U DNase I pro g Zellpellet zugefügt. Die Zellyse erfolgte mittels Sonikation (Branson Sonifier; 55% Amplitude, Puls an: 10 s, Puls aus: 50 s; Gesamtzeit, in der der Puls an war: 10 min) auf Eis. Die Inklusionskörper wurden durch 1 h Zentrifugation bei 16639 x g geerntet. Die erhaltenen Pellets wurden dreimal mit Lyse-Puffer gewaschen und zweimal mit ultrareinem Wasser (jeweils 15 min bei 15000 g). Anschließend wurden die Pellets in 30 mL Denaturierungs-Puffer, dem 1 mM Dithiothreitol (DTT) zugefügt wurde, bei 37°C und 180 rpm wieder aufgelöst. Nach 1 h Zentrifugation bei 16639 x g wurde die Lösung über die FPLC-Anlage (Biorad NGC Quest 10 Plus Chromatography System) mit einer Durchflussrate von 1 mL/min unter Rühren in 1x CTRLR Rückfaltung-Puffer mit 0,2 mM GSGG (ox.) und 1 mM GSH (red.) bei 4°C

mindestens 1:10 verdünnt und das Protein somit rückgefaltet (24 h lang). Nach 30 min Zentrifugation bei 16639 x g wurde der Überstand zur Dialyse in 5 L 1x MCBB gegeben. Nach einem weiteren Dialyseschritt gegen 5 L 1x MCBB wurde 30 min bei 16639 x g zentrifugiert, um präzipitiertes Protein abzutrennen. Anschließend erfolgte die Aufreinigung mittels Chromatographie über eine Mannan-Säule. Zuerst wurde die Säule mit ultrareinem Wasser und 1x MCBB (mannan-chromatography binding buffer) gewaschen und anschließend die Proteinlösung aufgetragen. Der Durchfluss der Lösung wurde gesammelt. Die Elution des Proteins erfolgte mit 1x TBS + 5 mM EDTA, es wurden Fraktionen von 1-2 mL gesammelt. Die Detektion, ob Protein vorhanden war, erfolgte in einer Mikrotiterplatte mit Coomassie und einer Farbreaktion nach Dunkelblau. Fraktionen wurden auf Proteingehalt mithilfe der Bradfordreagenz (Thermo Scientific Coomassie Plus Protein Assay Reagent) getestet (95 µL Coomassie pro well vorlegen, 5 µL der Fraktion hinzufügen). Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden vereint und zweimal gegen 5 L 1x HBS + 5 mM CaCl<sub>2</sub> dialysiert, für mindestens vier Stunden pro Dialyseschritt. Nach 30 min Zentrifugation bei 16639 x g erfolgte die Aufkonzentrierung ebenfalls über Zentrifugation (wiederholt 5 min bei 4000 x g) mit einem Amicon-Spinfilter. Die Konzentration wurde bei 280nm mittels NanoDrop bestimmt (IMPLEM NanoPhotometer; Extinktionskoeffizient für DC-SIGN ECD A<sub>280</sub>, 0,1% = 1.812). Die Proteinlösung wurde zum Schluss aliquotiert (100 oder 200 µL), mit flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und schließlich bei -80°C gelagert.

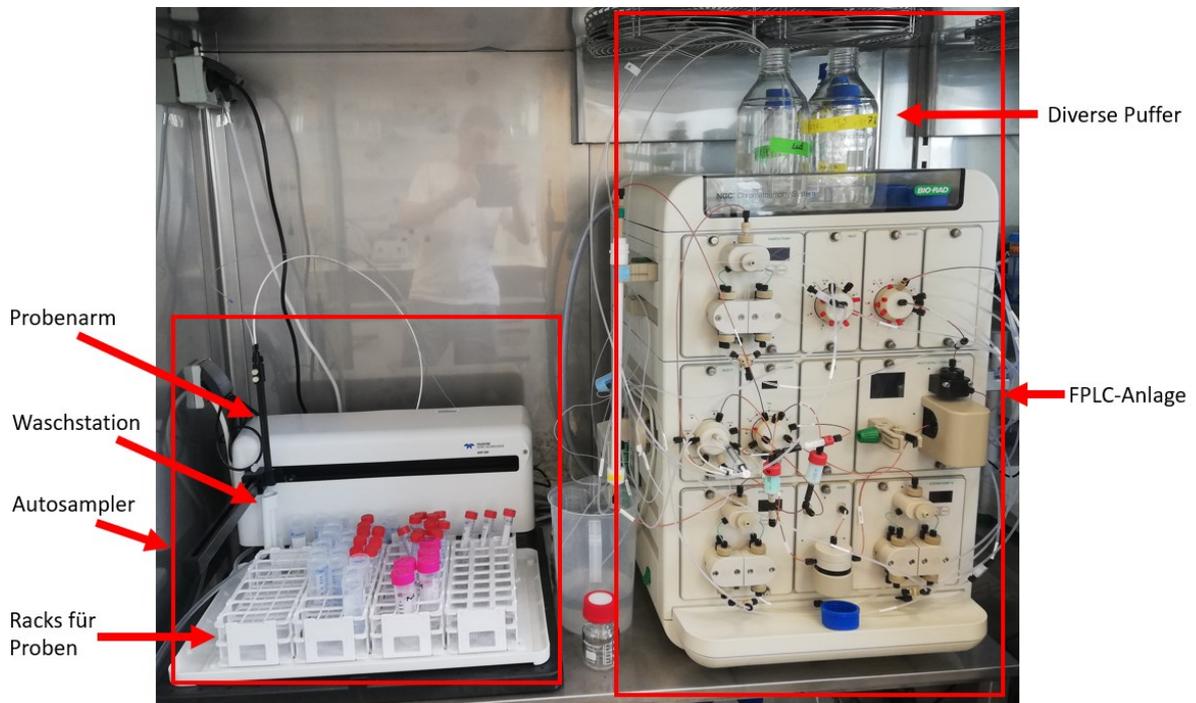
### **2.1.2 DC-SIGN CRD WT + Mutanten:**

Neben dem Wildtyp wurden die Mutanten E358A, F313A, F359L, I376V, N344Q, Q323A, T314A, T314S und W364F (pET28a-Plasmid, GenScript) exprimiert und aufgereinigt. Anstatt LB Medium wurde hierfür jedoch M9 Minimalmedium verwendet, welches <sup>15</sup>N gelabeltes NH<sub>4</sub>Cl enthält. Ansonsten erfolgte die Expression wie oben beschrieben. Auch das Ernten der Inklusionskörper (Sonikation, Waschen der Pellets) und deren Auflösung in Denaturierungs-Puffer erfolgte ident. Nach der Rückfaltung des Proteins wurde jedoch gegen 5 L 1x TBS + 5 mM CaCl<sub>2</sub> dialysiert. Nach 1 h Zentrifugation bei 16639 x g wurde mittels fast protein liquid chromatography (FPLC; Biorad NGC Quest 10 Plus Chromatography System) aufgereinigt (Puffer A = 1x TBS + 5 mM CaCl<sub>2</sub>, Puffer B = 1M Imidazol). Die Säule der FPLC-Anlage wird mit Nickel<sup>2+</sup> (Ni<sup>2+</sup>) beladen.

Es wird das Prinzip der Metall-Affinitätschromatographie (immobilized metal ion affinity chromatography = IMAC) genutzt. So erfolgte in diesem Fall die Elution durch stufenweise Erhöhung des prozentuellen Anteils von Puffer B an der Gesamtpuffermenge. Mit Hilfe des Chromatogramms wurden die Protein-enthaltenden Fraktionen identifiziert, vereint, und dann gegen 5 L 1x TBS + 5 mM CaCl<sub>2</sub> dialysiert. Der zweite Dialyseschritt wurde gegen 5 L 1x MES + 5 mM CaCl<sub>2</sub> durchgeführt. Die Aufkonzentrierung erfolgte wieder ident jener von DC-SIGN ECD, ebenso die Messung der Proteinkonzentration (Extinktionskoeffizient für DC-SIGN CRD A<sub>280</sub>, 0,1% = 2,966). Die Aliquotierung und Lagerung erfolgten wieder ident.

## **2.2 Automatisierung des Aufreinigungsvorganges mittels FPLC**

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Integration eines Autosamplers (Teledyne ASX-560, *Abb. 4*) in die FPLC-Anlage (Biorad NGC Quest 10 Plus Chromatography System), um die Proteinaufreinigung zu vereinfachen und auch mehrere verschiedene Proteine nacheinander aufreinigen zu können.

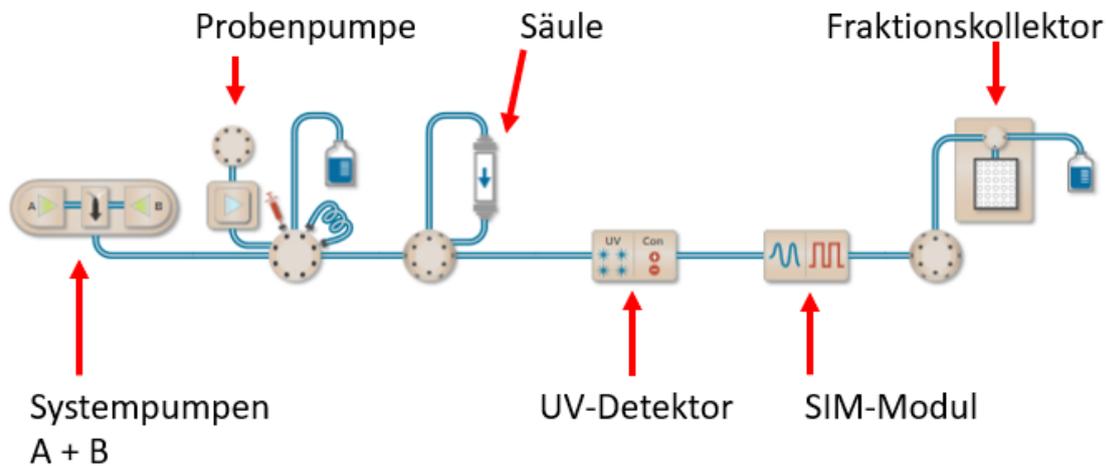


**Abbildung 4: Autosampler und FPLC-Anlage:** Der Probenarm des Autosamplers befindet sich in der Waschstation. In den Racks davor können die Probelösungen in Falcons platziert werden. Die aufgesaugte Probe gelangt über einen Schlauch an den S1 Port 1 der Probenpumpe an der FPLC-Anlage und wird somit in das System zur Proteinaufreinigung eingebracht.

Der Autosampler verfügt über einen Probenarm, welcher die Probelösung aufsaugt. Es ist eine Waschstation vorhanden, in der der Probenarm gereinigt wird. Hierfür wird ein Gefäß mit ultrareinem Wasser und ein Abfallgefäß benötigt. Als Probenbehälter wurden Falcons mit einem Volumen von 50 mL gewählt.

Schließlich wird der Autosampler an den S1 Port 1 der Probenpumpe der FPLC-Anlage angeschlossen. Die aufgesaugte Probelösung gelangt somit über diesen Anschluss zur FPLC-Anlage und die Aufreinigung kann beginnen. Zusätzlich zur Software der FPLC – *ChromLab* – muss auch die Software *AScript* verwendet werden, um den Ablauf richtig programmieren zu können. Die Kommunikation der beiden Geräte erfolgt über ein Signal Import Module (SIM). In der Software *AScript* musste ein Protokoll erstellt werden, in dem die Arbeitsschritte richtig aneinandergereiht und definiert wurden. Zuerst musste „Trigger the following on input from port“ aus Port 1 ausgewählt werden, da über diesen Port Autosampler und FPLC-Anlage miteinander verbunden wurden. Beim ersten

Schritt - „*Define Label*“ - musste „Start“ ausgewählt werden. Als nächstes wurde die „*Wait (Time)*“ mit 30 Sekunden festgelegt. Bei „*Wait for Port Input*“ wurde „Port 1 Open“ eingestellt. Mit dem Schritt „*Move to next Tube*“ wurde festgelegt, dass der Probenarm zum entsprechenden Probenbehälter mit der Proteinlösung wandert. „*Lower Sample Probe*“ beschreibt das Eintauchen des Probenarms in die Proteinlösung. Die Eintauchtiefe wurde mit 140 mm so gewählt, dass der Probenarm nicht den Boden des Falcons berührt und möglicherweise beschädigt wird, jedoch die ganze Probenlösung aufsaugen und zur FPLC-Anlage transportieren kann. Anschließend erfolgte eine „*Wait (Time)*“ von 60 Sekunden. Danach wurde bei einem erneuten Schritt mit „*Wait for Port Input*“ „Port 1 Closed“ eingestellt. Mit „*Move to Rinse*“ begibt sich der Probenarm zur Waschstation und wird gereinigt, die Eintauchtiefe wurde wieder mit 140 mm gewählt. Die nächste „*Wait (Time)*“ beträgt 360 Sekunden. Schließlich wird der Schritt „*Pump Off*“ eingefügt. Zum Schluss wird noch „*If Position ... Go to Label*“ angefügt. Dieser Schritt definiert die Anzahl der Durchläufe, die durchgeführt werden, und somit die Anzahl der aufgetragenen Proben. Für x Proben muss hier „ $< x+1$ “ ausgewählt werden, sowie „Goto Label Start“. Das System merkt sich den Standort des letzten Probenbehälters, und somit wandert der Probenarm bei Wiederholung des Protokolls im Falle mehrerer Proben bei „*Move to next Tube*“ zum nächsten Behälter.



**Abbildung 5: Module der FPLC-Anlage:** In der Software ChromLab lassen sich die einzelnen Module der FPLC-Anlage aneinanderfügen. Es können auch zusätzliche Module eingebaut werden, beziehungsweise kann die Reihenfolge verändert werden. In diesem Fall setzte sich das System aus den Modulen Systempumpen A+B, Probenpumpe, Säule, UV-Detektor, SIM-Modul und Fraktionskollector zusammen.

Bei ChromLab musste ebenfalls ein Protokoll erstellt werden, und hierfür in der Aneinanderreihung der einzelnen Module das SIM-Modul zur Kommunikation zwischen den Geräten eingefügt werden (Abb. 5). Die einzelnen Phasen waren Initialisation, Equilibration, Sample Application, Column Wash, Elution und eine erneute Column Wash. In der Initialisation- und Equilibration-Phase lässt sich der SIM-Status von „SIM Digital Out 1-4“ verändern. Hier ist es äußerst wichtig, dass in der Initialisation-Phase zunächst bei jedem SIM der Status auf „Stay low“ eingestellt ist. In der Equilibration-Phase muss jedoch der Status von „SIM Digital Out 1“ auf „Stay high“ geändert werden. Dies ist die Verknüpfung und Kommunikation mit dem Autosampler, hierzu wurde in AScript bei „Wait for Port Input“ „Port 1 Open“ eingestellt. So startet der Autosampler schließlich mit der Aufnahme der Probelösung, welche dann zur Probenpumpe der FPLC-Anlage transportiert wird. Der folgende Schritt im ChromLab-Protokoll ist die Sample Application – die Probelösung wird durch die Probenpumpe in das System der FPLC-Anlage gebracht und schließlich auf die Säule aufgetragen. Bei diesem Schritt müssen auch wieder alle SIM-Status auf „Stay low“ gestellt werden. Als Probenvolumen muss 50 mL gewählt, beziehungsweise auch etwas mehr, solange „Interrupt Injection If Air is Detec-

ted“ ausgewählt ist. So kann sichergestellt werden, dass das ganze Probenvolumen aufgesaugt wird, jedoch gestoppt wird, sobald Luft in das System eingebracht werden würde. Weiters ist noch zu beachten, dass bei „Sample Position“ „S1 Port 1“ und bei „Buffer Position“ „S1 Port 8“ ausgewählt ist, um die richtige Zuordnung von Probe und Puffern zu gewährleisten. Beim ersten Waschschrift (Column Wash) wird die Säule mit Puffer A gewaschen. Im Schritt Elution wird das Protein, welches an die Säule gebunden hat, durch eine Mischung mit 30% Puffer B eluiert und die Fraktionen werden gesammelt. Der zweite Column Wash erfolgt zunächst mit 100% Puffer B, um alles von der Säule abzulösen, dann mit 100% Puffer A, um die Säule zu waschen. Anhand der Chromatogramme kann entschieden werden, mit welchen Fraktionen weitergearbeitet wird. Entscheidend ist hierfür die Absorption bei 280 nm. Die angesaugte Luft, die sich im Probeschlauch des Autosamplers befindet, wird manuell über Primen an der Probenpumpe der FPLC-Anlage entfernt. Der Schlauch kann anschließend in der Waschstation des Autosamplers gewaschen werden. Dafür ist die Erstellung eines Protokolls in *Ascript* notwendig. Die Arbeitsschritte „*Move to Rinse*“, „*Lower Sample Probe*“ und „*Pump On*“ werden nacheinander eingefügt, mit „*Test Script*“ wird der Waschvorgang gestartet. Zum Beenden dieses Schrittes wird danach „*Pump Off*“ eingefügt.

Der Probenschlauch des S1 Port 8 der Probenpumpe war in ultrareinem Wasser, Systempumpe A in 1x TBS + 5 mM CaCl<sub>2</sub> (Puffer A) und die Systempumpe B in 1 M Imidazol (pH = 7,6; Puffer B). Nach Betrachtung des Chromatogrammes wurden die entsprechenden proteinenthaltenden Fraktionen jeder Mutante vereint und dann gegen 5 L 1x TBS + 5 mM CaCl<sub>2</sub> dialysiert. Der zweite Dialyseschritt erfolgte gegen 5 L 1x MES + 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Für die Aufkonzentrierung wurde die Proteinlösung zunächst 30 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurde in Amicon-Spinfiltern ebenfalls über Zentrifugation (wiederholt 5 min bei 4000 x g) aufkonzentriert. Mittels NanoDrop wurde die Konzentration bestimmt (Extinktionskoeffizient für DC-SIGN CRD A<sub>280</sub>, 0,1% = 2,966). Angestrebt wurde eine Konzentration von 5 mg/mL, die in den meisten Fällen auch erreicht wurde. Letztlich wurde die Proteinlösung wieder aliquotiert (zu 100 oder 200 µL) und mit flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Die Lagerung der Proteine erfolgte wieder bei -80°C.

## 2.3 Durchgeführte Assays

### 2.3.1 HRP-Assay

DC-SIGN ECD Wildtyp und die Mutanten wurden auf 96 well-Platten (Thermo Scientific MaxiSorp) über Nacht bei 4°C immobilisiert (50 µg/mL, 100 µL/well). Eine Ausnahme bildeten DC-SIGN ECD M270F und Q323A, die in einer Konzentration von 25 µg/mL verwendet wurden (100 µL/well). Es wurde mit Duplikaten gearbeitet. Nach drei Waschvorgängen mit 100 µL/well 1x HBS + 5 mM CaCl<sub>2</sub> wurden unspezifische Bindungen durch das Auftragen 100 µL/well ELISA-Blockpuffer für 2 h verhindert. Nachdem die Waschvorgänge wiederholt wurden, wurde die Platte mit Horse Radish Peroxidase (HRP) über Nacht und unter Lichtausschluss inkubiert. In die erste Reihe der Platten wurde 500 ng/mL HRP in ELISA-Waschpuffer aufgetragen. Dazu wurde die 1 µg/ml HRP-Stammlösung mit ELISA-Waschpuffer verdünnt. Anschließend wurde eine 1:1 Verdünnungsreihe hergestellt. Am nächsten Tag wurde nach erneutem dreimaligen Waschen 100 µL/well TMB Substrat aufgetragen und es konnte eine Farbreaktion nach Blau beobachtet werden. Die Reaktion wurde schließlich mit 100 µL/well 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt, es erfolgte eine Farbänderung nach Gelb. Die Absorption wurde schlussendlich bei 450 nm vermessen (PerkinElmer Multimode Plate Reader EnSpire 2300) (Aretz et al., 2018).

### 2.3.2 Biotin-Streptavidin-HRP-Assay

Hierfür wurden zwei Platten (Thermo Scientific MaxiSorp) verwendet, an denen bereits der HRP-Assay durchgeführt worden war und DC-SIGN ECD Wildtyp und Mutanten bereits immobilisiert waren (50 µg/mL, 100 µL/well), beziehungsweise DC-SIGN ECD M270F und Q323A mit 25 µg/mL und 100 µL/well. Es wurde auf den letzten beiden Reihen (G und H) der Platten gearbeitet. Zunächst wurden die wells beider Reihen einmal mit 100 µL/well 1x HBS + 5mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen. Anschließend wurden 50 µL/well des ersten Antikörpers, CD209 DC-SIGN AB antihuman Biotin (Miltenyi Biotec, 130-109-646), aufgetragen, der zuvor mit ELISA-Waschpuffer 1:10 verdünnt wurde. Die bei-

den Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde erneut einmal mit 100 µL/well 1x HBS + 5mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen. Das Streptavidin-HRP-Konjugat wurde 1:1000 mit ELISA-Waschpuffer verdünnt und schließlich mit 50 µL/well aufgetragen. Danach wurde für zwei Stunden unter Lichtausschluss bei 4°C inkubiert. Es folgten drei Waschvorgänge mit 100 µL/well 1x HBS + 5mM CaCl<sub>2</sub>. Danach wurden 100 µL/well TMB Substrat aufgetragen. Die Farbreaktion nach Blau wurde mit 100 µL/well 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt, es erfolgte eine Farbänderung nach Gelb. Die Absorption wurde bei 450 nm vermessen (PerkinElmer Multimode Plate Reader EnSpire 2300) (Aretz et al., 2018).

## 2.4 Verwendete Puffer

**Tabelle 1: Zusammensetzung von 10x TBS**

10x TBS	
NaCl	1,5 M
TRIS	0,5 M
	pH auf 7,8 eingestellt

**Tabelle 2: Zusammensetzung von 10x MCBB**

10x MCBB	
NaCl	1,5 M
TRIS	0,25 M
CaCl <sub>2</sub>	0,33 M
	pH auf 7,8 eingestellt

**Tabelle 3: Zusammensetzung von 2x CTLR Rückfaltung-Puffer**

<b>2x CTLR Rückfaltung-Puffer</b>	
NaCl	0,04 M
TRIS	0,1 M
KCl	1,6 mM
L-Arginin	0,8 M
	pH auf 8,3 eingestellt

**Tabelle 4: Zusammensetzung des Lyse-Puffers**

<b>Lyse-Puffer</b>	
TRIS	0,05 M
MgCl <sub>2</sub>	0,02135 M (Joni MA: 10mM)
TritonX-100	0,1%
	pH auf 7,5 eingestellt

**Tabelle 5: Zusammensetzung des Denaturierungspuffers**

<b>Denaturierungs-Puffer</b>	
TRIS	0,1 M
Guanidin-Hydrochlorid	6 M
	pH auf 8 eingestellt

**Tabelle 6: Zusammensetzung von 10x HBS**

<b>10x HBS</b>	
HEPES	250 µM
NaCl	1,5 M
	pH auf 7,4 eingestellt

**Tabelle 7: Zusammensetzung von 10x MES**

<b>10x MES</b>	
MES	0,25 M
NaCl	400 µM
	pH auf 6 eingestellt

**Tabelle 8: Zusammensetzung des ELISA-Waschpuffers**

500 mL ELISA-Waschpuffer	
10x HBS	50 mL
Ultrapures Wasser	450 mL
5 M CaCl <sub>2</sub>	500 µL
Tween 20	500 µL

**Tabelle 9: Zusammensetzung des ELISA-Blockpuffers**

50 mL ELISA-Blockpuffer	
10x HBS	5 mL
Ultrapures Wasser	450 mL
5 M CaCl <sub>2</sub>	50 µL
Tween 20	50 µL
Bovines Serumalbumin	1 g

Die Puffer, welche in zehnfacher bzw. zweifacher Konzentration hergestellt wurden, wurden in einfacher Konzentration verwendet und dazu vor Gebrauch 1:10 bzw. 1:1 mit ultrapur Wasser verdünnt. Für die Einstellung des pH-Wertes der Puffer wurden 37% HCl (6 mol/l = 6 N) und 5 M NaOH verwendet.

## 2.5 Verwendete Medien für die Expression

### LB-Medium

**Tabelle 10: Zusammensetzung von M9-Minimalmedium**

<b>M9-Minimalmedium</b>	
10x M9-Salze	100 mL
20 % Glucose solution	20 mL
100 x Trace metal-Mix	10 mL
500 x Vitaminmix	2 mL
1 M MgCl <sub>2</sub>	1 mL
1 M CaCl <sub>2</sub>	0,3 mL
1 M NaSO <sub>4</sub>	1 mL
Kanamycin	1 mL

**Tabelle 11: Zusammensetzung der 10x M9-Salze**

<b>10x M9-Salze</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22 mM
NaCl	8,55 mM
NH <sub>4</sub> Cl ( <sup>15</sup> N labeled)	9,35 mM

**Tabelle 12: Zusammensetzung des 100x Trace metal-Mixes**

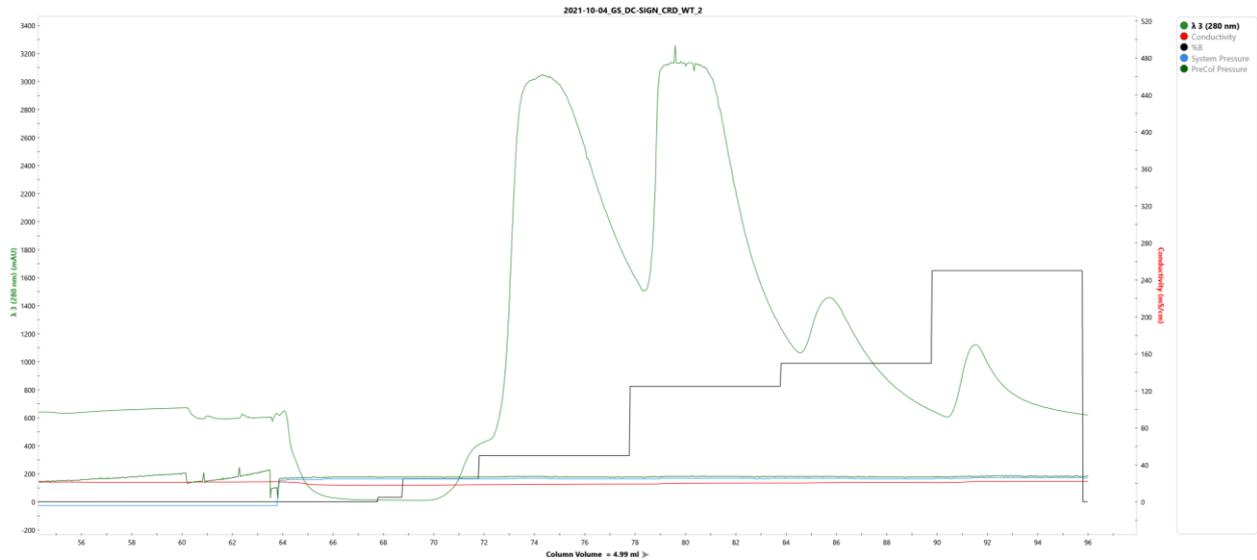
<b>100x Trace metal-Mix</b>	
FeCl <sub>3</sub>	1 µM
ZnCl <sub>2</sub>	6,2 µM
CuCl <sub>2</sub>	760 nM
CoCl <sub>2</sub>	420 nM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,62 µM
MnCl <sub>2</sub>	81 nM

**Tabelle 13: Zusammensetzung des 500x Vitaminmixes**

<b>500x Vitaminmix</b>	
Biotin	1 µg/L
Thiamin	1 µg/L
Riboflavin	0,5 µg/L
Niacinamid	0,5 µg/L
Pyridoxin-Hydrochlorid	0,5 µg/L

### 3 Ergebnisse

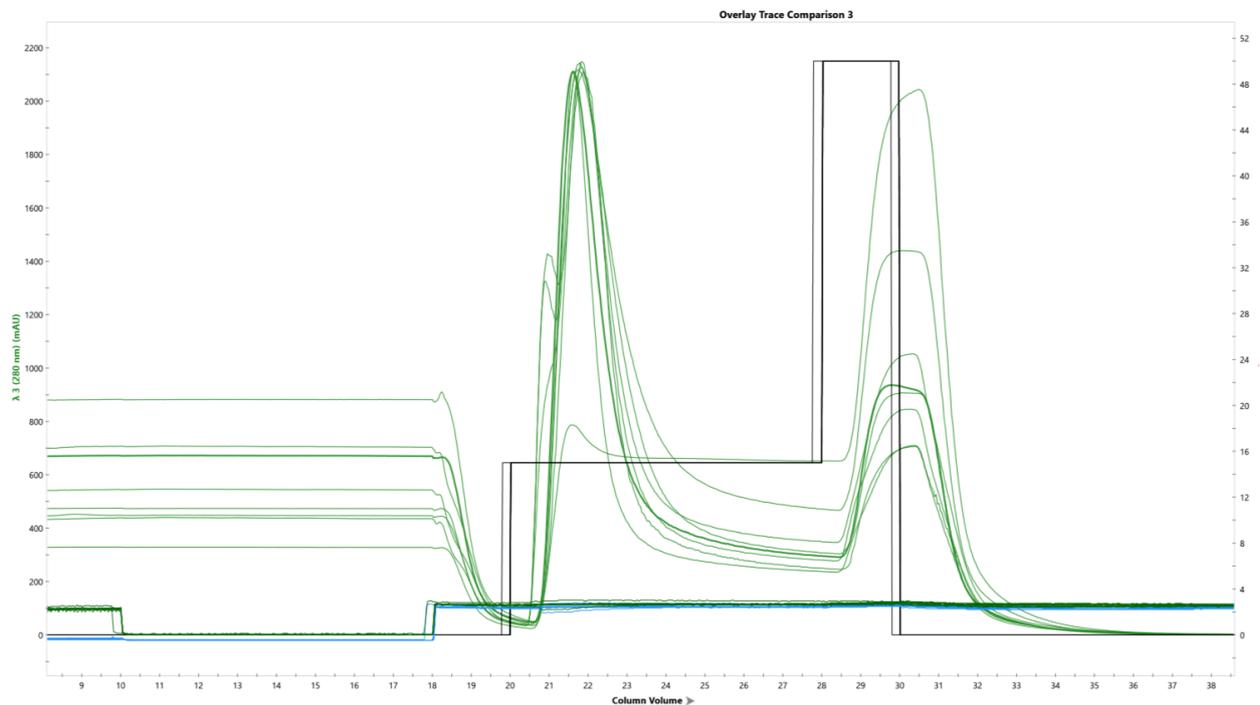
Jede Aufreinigung an der FPLC liefert ein Chromatogramm über den gesamten Vorgang - vom Auftragen der Proteinlösung, über die Elution, bis hin zur erhaltenen Proteinmenge (*Abb. 6*). Neben dem Vorhandensein von Protein können dem Chromatogramm auch weitere Parameter entnommen werden, die auf mögliche Fehler oder Probleme hinweisen. Proteine werden bei einer Wellenlänge von 280nm detektiert (in grün). Die Imidazolzugabe (Puffer B) zur Elution des Proteins wird als schwarze Linie dargestellt, der Prozentanteil des Puffers wird schrittweise erhöht. Die Detektion des Proteins durch den UV-Detektor erfolgt, wie sich gut im Chromatogramm erkennen lässt, kurz nach Erhöhung des Imidazolanteils. In diesem Fall erfolgte die Elution der Hauptmengen des Proteins (bei rund 3000 mAU) bei zwei verschiedenen Imidazolkonzentrationen. Am Schluss wird mit 100% Imidazol das restliche Protein von der Säule gelöst. Die Nummer A... gibt die Position der gesammelten Fraktion im Fraktionskollektor an. Ab A1 werden die Fraktionen nach beginnender Elution gesammelt, alles, was davor sichtbar ist, bezieht sich auf die Aufbringung der Probe auf die Säule. Hier wird der Durchfluss, der ebenfalls gesammelt wird, vom Detektor angezeigt. Bindet das gesuchte Protein nicht auf der Säule, wäre bereits hier die Absorption bei 280nm in einem Bereich von etwa 3000 mAu. Anhand der Kurve wird entschieden, welche Fraktionen ausreichend Protein enthalten und weiterverarbeitet werden. Zusätzlich wird in rot die elektrische Leitfähigkeit angegeben – diese steigt beispielsweise bei Pufferzugabe und kann als Parameter für einen ausreichenden Waschvorgang herangezogen werden, wenn sie auf null sinkt. Der Druck im System ist im Chromatogramm als hellblaue Linie dargestellt, und wird beobachtet, um Schädigungen am Gerät vorzubeugen. Steigt er zu hoch an, muss zum Beispiel die Flussrate reduziert werden.



**Abbildung 6: Chromatogramm von DC-SIGN CRD WT:** in Grün = Absorption bei 280 nm; in schwarz/stufenförmig = Erhöhung des Imidazolanteils zur Elution; bei rund 3000 mAU wurde ein großer Anteil von DC-SIGN CRD WT, welcher von der Nickelsäule losgelöst wurde, vom Detektor detektiert (1. und 2. hoher Peak); es ist ersichtlich, dass der 2. hohe Peak nach Erhöhung des Imidazolsanteil folgt; auch nach den nächsten zwei Erhöhungen sind noch Anstiege in der Absorption zu beobachten; rot = elektrische Leitfähigkeit; hellblau = Druck des Systems

### 3.1 Integration des Autosamplers

Die Integration des Autosamplers in die FPLC-Anlage erfolgte gemäß der Beschreibung in den Materialien und Methoden. Angeschlossen wurde der Autosampler an den S1 Port 1 der Probenpumpe der FPLC. Die Aufnahme der Probelösungen erfolgte über den Probenarm, über den vorhin beschriebenen Anschluss gelangten die Proben in das System der FPLC. Die Softwares ChromLab und AScript, deren Kommunikation über ein SIM erfolgte, wurden verwendet, um den Ablauf zu programmieren. Im Schritt „If Position ... Go to Label“ in AScript wurde die Anzahl der Durchläufe des Protokolls, und somit die Anzahl der Proben. Für in diesem Fall neun Proben musste hier der Wert 10 eingetragen werden. In ChromLab war das Einfügen des SIM ein entscheidender Schritt. Durch die erfolgreiche Integration des Autosamplers konnten in diesem Fall bis zu neun verschiedene DC-SIGN CRD Mutanten, von denen jeweils pro Versuch bis zu 50 mL Proteinlösung verwendet wurden, nacheinander aufgereinigt werden (Abb. 7).



**Abbildung 7: überlagertes Chromatogramm von neun hintereinander aufgereinigten DC-SIGN CRD Mutanten:** in grün ist die Absorption bei 280nm angezeigt; die schwarze Linie zeigt den Einsatz von Puffer B (1M Imidazol) zur Elution an; somit ist ersichtlich, dass nach 30% Puffer B der Großteil des gewünschten Proteins abgelöst wurde, und vom UV-Detektor erkannt wird (y-Achse, ~2200 mAU), bei 100% Puffer B wird schließlich der Rest von der Säule gelöst. Es ist gut erkennbar, dass die Chromatogramme der einzelnen Mutanten sehr ähnlich sind. Vor allem die Peaks der Proteinfraktion sind äußerst gleichförmig in Höhe und Breite. Bei der Mutante T314S war in diesem Fall kein Protein vorhanden, der Peak nach Zugabe von 30% Puffer B ist bei etwa 800 mAU ersichtlich.

### 3.2 DC-SIGN CRD – Ausbeute

Die folgende Tabelle (*Tab. 14*) gibt die Ausbeuten von DC-SIGN CRD und seinen Mutanten aus all den durchgeführten Aufreinigungen in mg pro Liter Expressionskultur an. Die Proteine wurden  $^{15}\text{N}$ -gelabelt, um HSQC-NMR durchführen zu können. Die NMR-Spektren haben gezeigt, dass alle Proteine richtig gefaltet waren (*siehe Appendix, ergänzende Abb. 10-19*). Am Beispiel eines Chromatogramms von DC-SIGN CRD WT wird die Aufreinigung an der FPLC dokumentiert und entschieden, mit welchen Fraktionen weitergearbeitet wird (*Abb. 6*). Die restlichen Chromatogramme sind im Appendix einsehbar (*ergänzende Abb. 1-9*).

**Tabelle 14:** Ausbeuten von DC-SIGN CRD und den Mutanten (in mg/L Kultur)

<b>DC-SIGN CRD</b>	<b>Ausbeute</b>
WT	5,8 mg/mL
F359L	5,53 mg/L Kultur
W364F	5,4 mg/L Kultur
Q323A	7,48 mg/L Kultur
E358A	6,33 mg/L Kultur
F313A	7,6 mg/L Kultur
I376V	6,01 mg/L Kultur
N344Q	8,07 mg/L Kultur
T314S	4,66 mg/L Kultur
T314A	6,2mg/L Kultur

### 3.3 DC-SIGN ECD – Ausbeute

Die nachfolgende Tabelle (*Tab. 15*) gibt die Ausbeuten von DC-SIGN ECD und seinen Mutanten aus all den durchgeführten Aufreinigungen in mg pro Liter Expressionskultur an. Die übrigen DC-SIGN ECD Mutanten wurden im Vorhinein von Hengxi Zhang (MDT Group, University of Vienna) exprimiert und aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte manuell über eine Mannan-Säule. Die Elution des Proteins erfolgte durch das Aufbringen von 1x TBS + 5 mM EDTA auf die Säule. Mithilfe von Coomassie und des Bradfordreagenz wurden die gesammelten Fraktionen auf den Proteingehalt getestet. Proteinenthaltende Fraktionen wurden vereint, dialysiert und anschließend aufkonzentriert.

**Tabelle 15:** Ausbeuten von DC-SIGN ECD und den Mutanten (in mg/L Kultur)

<b>DC-SIGN ECD</b>	<b>Ausbeute</b>
WT	5,3 mg/mL
I376A	9 mg/L Kultur
N344Q	0,59 mg/L Kultur
I376V	11 mg/L Kultur

### 3.4 Auswertung der funktionalen HRP-Assays

Die beiden Assays wurden mit DC-SIGN ECD durchgeführt, da diese Tetramere bilden und somit an die Mikrotiterplatte binden können. Dies ist mit der CRD allein nicht möglich.

#### 3.4.1 Analyse des Biotin-Streptavidin-HRP-Assays

Mit diesem Assay wurde überprüft, ob DC-SIGN ECD Wildtyp und die Mutanten gleich stark an die 96 well Platte gebunden haben. Es wurden Platten verwendet, an denen bereits der HRP-Assay durchgeführt worden war. Als Referenz wurde 1x HBS + 5mM CaCl<sub>2</sub> verwendet. Der erste Antikörper - CD209 DC-SIGN AB antihuman Biotin - wurde verwendet, um an DC-SIGN zu binden. Das anschließend aufgetragene Streptavidin-HRP-Konjugat, um an Biotin zu binden, und um mit der Zugabe von TMB-Substrat die Farbreaktion durchführen zu können. Deren Absorption wurde bei 450 nm vermessen. Pro Mutante wurden vier wells vermessen und daraus der Mittelwert gebildet (*Tab. 17*).

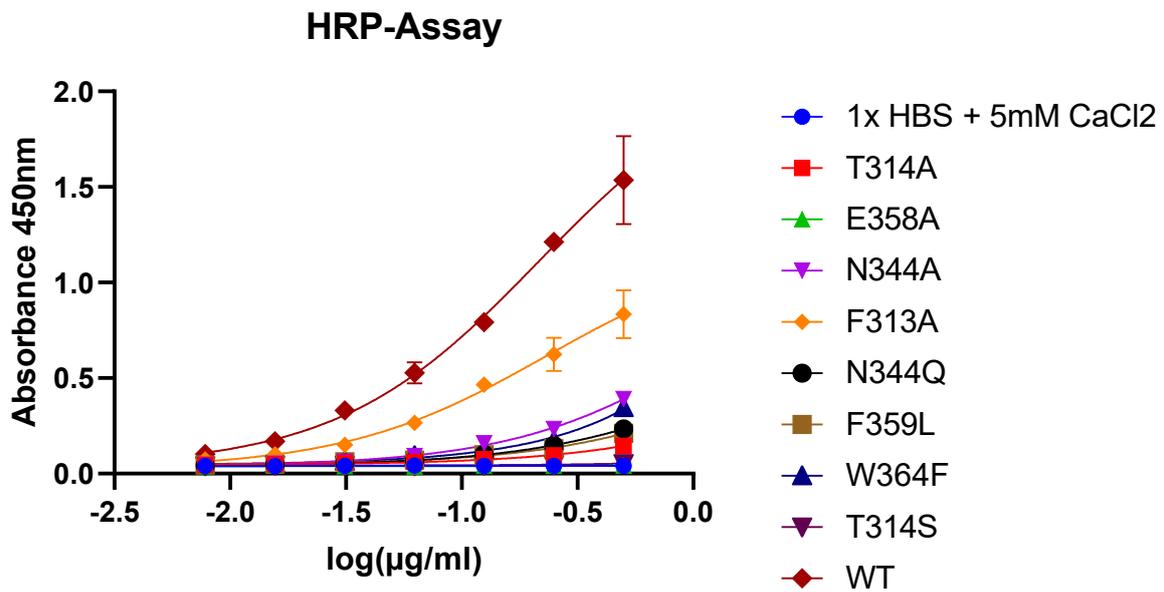
**Tabelle 16:** Mittelwert der Absorption bei 450nm von DC-SIGN ECD und den Mutanten. Der Mittelwert von 1x HBS + 5 mM CaCl<sub>2</sub> ist als Referenz angegeben. Mittelwert der Absorptionen (ohne 1x HBS): 0,8364; Standardabweichung: 0,4657;

DC-SIGN ECD	Mittelwert der Absorption bei 450nm
WT	0,6
T314A	0,6
E358A	0,2
N344A	1,5
F313A	0,2
M270F	1,5
Q323A	0,9
N344Q	1,4
F359L	1,1
W364F	0,8
T314S	0,4
1x HBS + 5 mM CaCl <sub>2</sub> (Referenz)	0,1

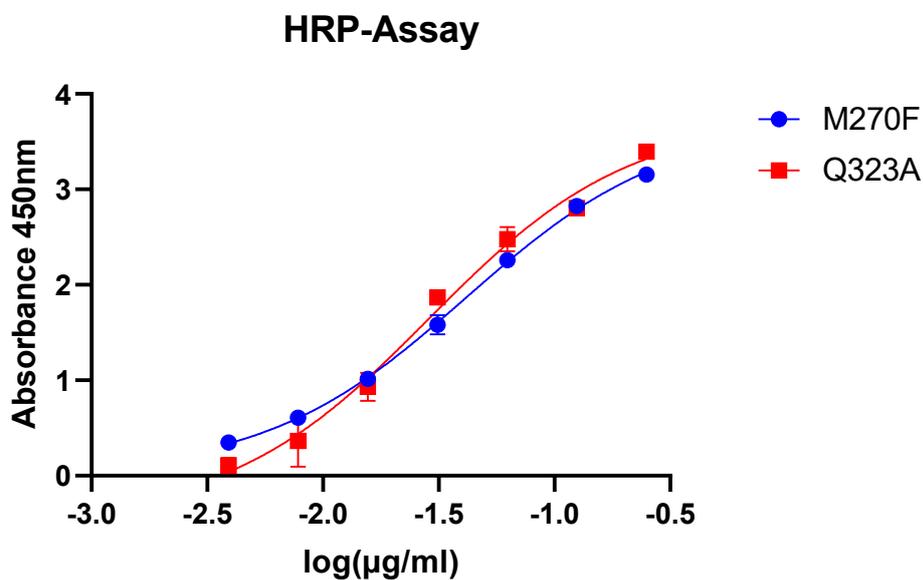
Auf den ersten Blick ist ersichtlich, dass die verschiedenen Mutanten und der Wildtyp deutliche unterschiedliche in der Absorption aufweisen (*Tab. 16*), und demnach auch in unterschiedlicher Menge an die Platte gebunden haben. Zusätzlich gehört erwähnt, dass schon der Background (1x HBS + 5mM CaCl<sub>2</sub>) ein Signal von 0,1 gibt. So weisen die Mutanten E358A und F313A die schwächste Absorption auf, nur doppelt so hoch wie die Referenz 1x HBS + 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Im Vergleich dazu zeigt M270F trotz der nur halben aufgetragenen Konzentrationen mit einer Absorption von 1,5 den höchsten Wert, gemeinsam mit N344A. An dritter Stelle liegt N344Q mit 1,4. Schließlich folgt F359L mit 1,1 und danach mit Q323A die andere Mutante, die nur in halber Konzentration verwendet wurde. Sie weist immer noch eine viereinhalb Mal so hohe Absorption wie E358A und F313A auf. Der Wildtyp und T314A zeigen beide einen Wert von 0,6, während T314S mit 0,4 schwächer bindet. Der Mittelwert aller Mutanten und des Wildtyps (ohne 1x HBS + 5 mM CaCl<sub>2</sub>) beträgt gerundet 0,8364, liegt also in etwa zwischen W364F und Q323A. So lässt sich feststellen, dass Wildtyp und Mutanten in unterschiedlichen Mengen an der Platte immobilisiert wurden, was wiederum Auswirkung auf die Berechnung des EC<sub>50</sub>-Wertes haben könnte.

### **3.4.2 HRP-Assay**

Der HRP-Assay wurde durchgeführt, um die EC<sub>50</sub> zu ermitteln und die erhaltenen Ergebnisse von DC-SIGN ECD und den Mutanten anschließend vergleichen zu können. Nach Immobilisierung von DC-SIGN WT und der Mutanten wurde HRP zugegeben und eine 1:1 Verdünnung erstellt. Durch die Zugabe von TMB Substrat wurde eine Farbreaktion erzeugt, deren Absorption bei 450nm vermessen wurden.



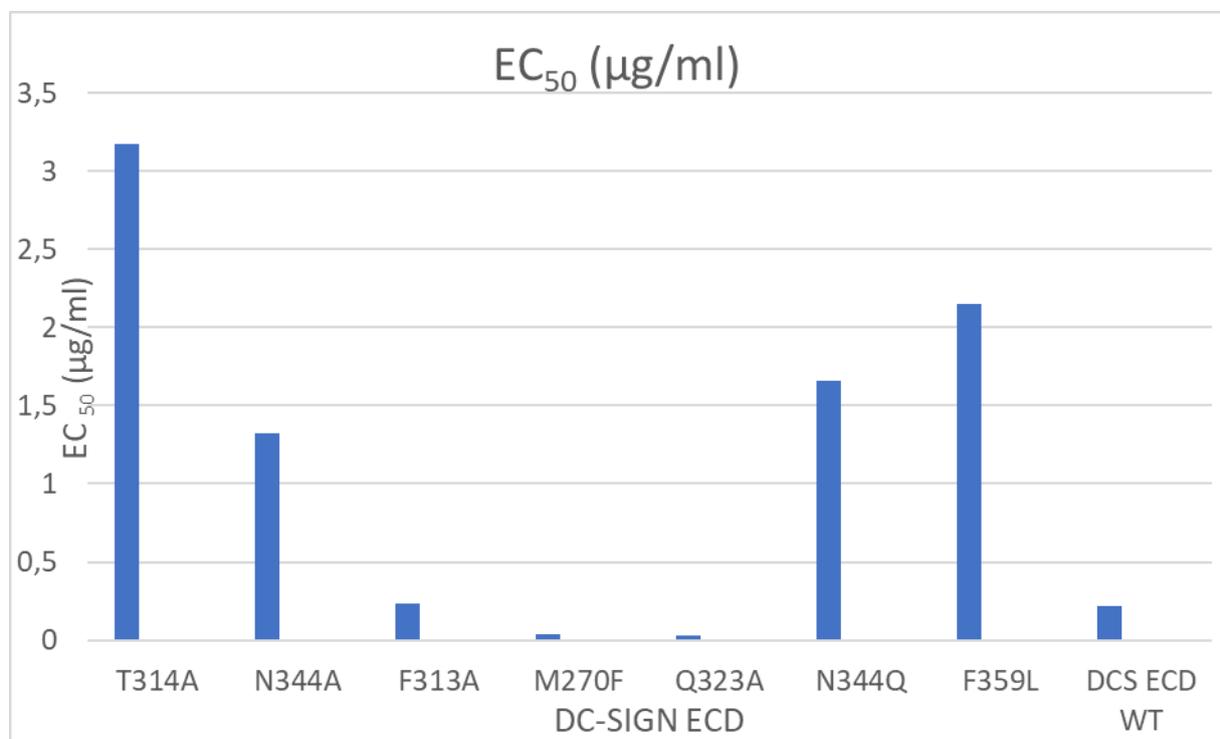
**Abbildung 8: HRP-Assay:** Nonlin-fit, log(agonist) vs. Response (three parameters); aufgetragene Konzentration der Mutanten = 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{L/well}$



**Abbildung 9: HRP-Assay 2:** Nonlin-fit, log(agonist) vs. Response (three parameters); aufgetragene Konzentration der Mutanten: 25  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{L/well}$

**Tabelle 17:** EC<sub>50</sub>-Werte (in µg/mL) und R<sup>2</sup> von DC-SIGN ECD und den Mutanten, basierend auf dem HRP-Assay; Mittelwert der detektierten EC<sub>50</sub>-Werte: 1,1088 µg/mL; Standardabweichung: 1,1129;

DC-SIGN ECD	EC <sub>50</sub> (µg/mL)	R <sup>2</sup>
T314A	3,2	0,96
E358A	nicht detektierbar	
N344A	1,3	0,99
F313A	0,2	0,97
M270F	0,04	0,99
Q323A	0,03	0,99
N344Q	1,7	0,99
F359L	2,2	0,95
W364F	nicht detektierbar	
T314S	nicht detektierbar	
WT	0,2	0,98



**Abbildung 10:** Diagramm der EC<sub>50</sub>-Werte von DC-SIGN ECD und seinen Mutanten: DC SIGN ECD E358A, W364F und T314S waren nicht detektierbar.

Vergleicht man die Immobilisierung (Tab.16) nun mit den EC<sub>50</sub>-Werten aus dem HRP-Assay (Tab. 17, Abb. 10), lässt sich abschätzen, ob diese Werte von der an die Platte gebundenen Proteinmenge abhängig sind. Die deutlich niedrigsten EC<sub>50</sub>-Werte zeigen jene Mutanten, die nur in halber Konzentration aufgetragen wurden: Q323A und M270F (Abb. 9). M270F war auch jene Mutante, die am besten an die Platte gebunden hatte. Q323A zeigt den niedrigsten EC<sub>50</sub>-Wert, der Wert aus dem Immobilisierungs-Assay liegt zwar im Mittelbereich, jedoch wurde aber auch nur in halber Konzentration aufgetragen.

Den nächstniederen Wert besitzt dann der Wildtyp, trotz durchschnittlicher Immobilisierung. Die Mutante F313A weist zwar eine schlechte Bindung an die Platte auf, jedoch auch einen niederen  $EC_{50}$ -Wert (0,2). Hier zeigt sich, dass möglicherweise keine Korrelation zwischen immobilisierter Proteinmenge und  $EC_{50}$ -Wert besteht. Als nächstes folgen mit N344A und N344Q jene Mutanten, welche die zweit- und dritthöchste Bindung an die Platte aufweisen. Die  $EC_{50}$ -Werte liegen bei 1,3  $\mu\text{g/mL}$  und 1,7  $\mu\text{g/mL}$ . F359L rangiert sowohl bei  $EC_{50}$ , als auch bei der Immobilisierung gleich dahinter. Die Mutante T314A zeigt mit 3,2  $\mu\text{g/mL}$  den nächsthöheren Wert, was eigentlich auch mit der schwächeren Bindung der Mutante an die Platte korreliert. Die  $EC_{50}$ -Werte von T314S, W364F und E358A liegen in einem 100 – 100000 mal höheren Bereich, im Vergleich zu allen anderen Mutanten. In diesen Fällen ist eine Bindung nicht mehr nachweisbar. E358A zeigt auch bei der Immobilisierung den schlechtesten Wert, T314S weist dort den drittniedrigsten auf. Abschließend lässt sich für bestimmte Mutanten wohl eine Korrelation zwischen Immobilisierung und  $EC_{50}$ -Wert erkennen – gute Proteinbindung an die Mikrotiterplatte führt zu einem niederen  $EC_{50}$ -Wert, wie es zum Beispiel bei M270F der Fall ist. Die Mutanten N344A, N344Q und F359L zeigen trotz besserer Bindung zwar nicht die niedersten  $EC_{50}$ -Werte, rangieren aber zumindest in Relation zueinander. Beim Wildtyp und bei F313A ist keine Korrelation ersichtlich. Bezüglich der Mutante Q323A (niedrigster  $EC_{50}$ -Wert) kann man möglicherweise auch von leichter Korrelation sprechen, da die Immobilisierung eher im oberen Bereich ist, jedoch auch nur eine Konzentration von 25  $\mu\text{g/mL}$  aufgetragen wurde.

## 4 Diskussion

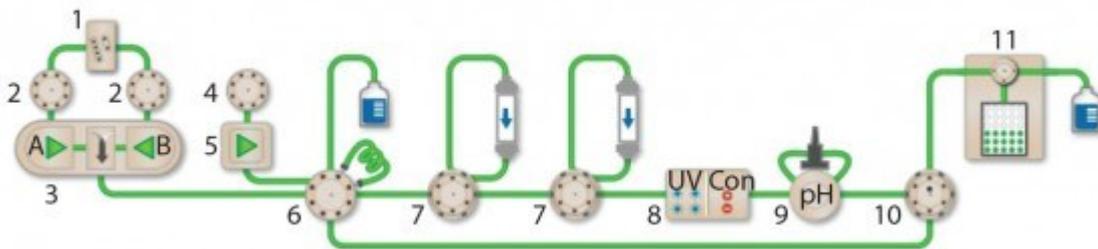
Hauptaugenmerk dieser Arbeit war die Integration eines Autosamplers in das System der FPLC. Der Hintergedanke dabei war, die Aufreinigung von DC-SIGN CRD und seinen Mutanten zu erleichtern und nacheinander eine größere Menge von verschiedenen Mutanten in einem Prozess aufzureinigen zu können. Dies war notwendig, da für die Durchführung von NMR-Experimenten eine große Menge von DC-SIGN erforderlich war. Das Aufsetzen eines erfolgreichen Protokolls schafft hier Abhilfe, jedoch ist das System auch gewissen Grenzen ausgesetzt, beziehungsweise gibt es weiteres Verbesserungspotential.

Die DC-SIGN Mutanten wurden durch Veränderung einer einzelnen Aminosäure erzeugt. Dies geschah an vielversprechenden Positionen, die möglicherweise interessante Auswirkungen auf das Protein haben. Diese können die Funktion oder Struktur betreffen. So würde eine mögliche Modulierung der allosterischen Bindungsstelle ein vielversprechendes Ziel für weitere Nachforschungen darstellen, da davon auch beispielsweise die primäre Bindungsstelle, die Konformation und Bindungsaffinitäten betroffen sind. Mit diversen Assays lassen sich wichtige Parameter, wie zum Beispiel die  $EC_{50}$ , berechnen und somit der WT und die Mutanten vergleichen. Dadurch erhält man die Möglichkeit zu erkennen, welchen Mutanten mehr Potential für weitere Nachforschungen eingeräumt werden kann.

### 4.1 Autosampler

Die Integration des Autosamplers bringt den Vorteil der automatischen Aufreinigung mehrerer unterschiedlicher Proteinproben hintereinander mit sich, ohne dazwischen Änderungen am Gerät vornehmen zu müssen. Dies erweist sich als hilfreich, wenn für weitere Experimente, wie in diesem Fall zum Beispiel NMR, gewisse Proteinmengen erforderlich sind. Durch Upscaling ließen sich vermutlich noch weitere Verbesserungen vornehmen, welche die Aufreinigung und folgende Arbeitsschritte erleichtern. So könnte

man beispielsweise als nächsten Schritt die Proteinlösung nach der Aufreinigung mittels IMAC über die Nickel-Säule nicht sofort in Fraktionen sammeln, sondern über eine weitere Säule laufen lassen. Die Nachschaltung einer Desalting-Säule könnte genutzt werden, um das Imidazol aus der Proteinlösung zu entfernen. Hiermit könnte man sich die zeitaufwendigen Dialyseschritte der Proteinfractionen ersparen (Dauer: zwei Durchgänge, mindestens vier Stunden). Für diese *multi dimensional chromatography* müssen jedoch auch die technischen Voraussetzungen an der FPLC gegeben sein. Es muss gewährleistet sein, dass die Proteinlösung, beziehungsweise die entsprechenden, Protein enthaltenden Fraktionen direkt nach der IMAC-Säule auf die Desalting-Säule gelangen. Dies könnte geschehen, indem die Proteinlösung über ein Column switching valve auf die nachfolgende Säule gepumpt wird. (Abb. 11)



**Abbildung 11: NGC Discover 10 Pro System mit einem zusätzlichem Column switching valve:** 1 = buffer blending valve, 2 = buffer inlet valves, 3 = System Pumps, 4 = sample inlet valve, 5 = Sample Pump, 6 = sample injection valve, 7 = Column switching valves, 8 = Multiwavelength Detector with integrated conductivity monitor, 9 = pH module, 10 = outlet valve, 11 = BioFrac fraction collector. (<https://bioprocessintl.com/downstream-processing/chromatography/automated-purification-of-native-and-recombinant-proteins-using-multidimensional-chromatography/>)

Fehlt jedoch diese Einheit, könnte sich die Durchführung komplexer darstellen. Die Proteinlösung müsste hierbei wohl über ein Sample Loop zurück zur Sample Pump zurückgebracht werden, und anschließend auf die nächste Säule aufgebracht werden. Zu beachten ist in diesem Fall, dass an der Sample Pump der Port gewechselt werden muss, damit die richtige Säule eingestellt ist. Möglicherweise müsste man in diesem Fall zwei Durchläufe im Method Editor planen. Im zweiten würde dann die Probe aus dem Sample Loop auf die andere Säule aufgetragen werden.

Weitere limitierende Faktoren für eine Aufreinigung in größerem Maßstab könnten die Zeitdauer und Volumina der Proben und auch von Puffern sein. In den meisten Fällen dauerten Aufreinigungsvorgänge mit unserem Gerät für ein Protein je nach Probenmenge eineinhalb bis zwei Stunden. Zu beachten ist, dass die Flow Rate für das Aufbringen der Proteinlösung unter 5 mL pro Minute liegt. Für eine größere Anzahl verschiedener Proteine summiert sich hier die Zeit enorm, wenn man eine bestimmte Probenmenge verwenden will, um eine entsprechende Ausbeute zu erzielen. Da durch eine höhere Flow Rate das System möglicherweise einem zu hohen Druck ausgesetzt sein kann, lässt sich dadurch die Laufzeit nicht verkürzen. Hierfür kommt als einzige Möglichkeit wohl eine geringere Probenmenge in Frage. Für eine große Anzahl von Proben mit einem Standardvolumen kann vermutlich ein ganzer Tag zur Aufreinigung eingeplant werden. Selbstverständlich kann man das Gerät über Nacht arbeiten lassen, jedoch im Falle eines auftretenden Problems nicht eingreifen. Zusätzlich ist zu beachten, dass pro Aufreinigung gewisse Puffermengen erforderlich sind. Umso mehr Proteine aufgereinigt werden, desto größere Puffervolumina müssen zur Verfügung gestellt werden. Außerdem muss beachtet werden, dass die Säule zwischendurch neu mit Nickel beladen werden muss, um eine effiziente Aufreinigung zu gewährleisten.

## **4.2 HRP-Assay und Biotin-Streptavidin-HRP-Assay**

Betrachtet man die Werte aus den durchgeführten Assays und stellt die Absorptionen gegenüber den  $EC_{50}$ -Werten gegenüber, lässt sich für bestimmte Mutanten eine Korrelation zwischen Immobilisierung und  $EC_{50}$ -Wert erkennen. Im Grunde bedeutet dies, dass eine gute Bindung des Proteins an die Mikrotiterplatte zu einem niedrigeren  $EC_{50}$ -Wert führt. Für die Mutante M270F ist dies wohl der Fall. Die Mutanten N344A, N344Q und F359L zeigen trotz besserer Bindung zwar nicht die niedrigsten  $EC_{50}$ -Werte, rangieren aber zumindest in Relation zueinander. Beim Wildtyp und bei F313A ist keine Korrelation ersichtlich. Bezüglich der Mutante Q323A (niedrigster  $EC_{50}$ -Wert) kann man möglicherweise auch von leichter Korrelation sprechen, da die Immobilisierung eher im oberen Bereich ist, jedoch auch nur eine Konzentration von 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aufgetragen wurde. Die  $EC_{50}$ -Werte von T314S, W364F und E358A liegen in einem 100 – 100000mal höheren

Bereich, im Vergleich zu allen anderen Mutanten. In diesen Fällen ist eine Bindung nicht mehr nachweisbar.

Dadurch, dass die Mutanten jedoch in unterschiedlicher Stärke an die Platten gebunden haben, ist der Assay nicht optimal für deren Vergleich geeignet. Stattdessen könnten in diesem Fall andere Methoden, wie zum Beispiel surface plasmon resonance (SPR), Anwendung finden. Könnte man gewährleisten, dass alle Mutanten gleich gut binden, ließen sich auch die Ergebnisse und Aussagen darüber besser vergleichen.

Im Vergleich mit dem WT haben in den durchgeführten Assays die Mutanten unterschiedliche Ergebnisse geliefert. Dies könnte auch Hinweise darauf geben, an welchen Positionen Veränderungen in der Aminosäuresequenz besonders interessant sind. Abschließend lässt sich sagen, dass weitere Nachforschungen von Nöten sind, um die verschiedenen Mutanten im Vergleich zum WT besser einordnen zu können.

## Literaturverzeichnis

Aarnoudse, C.A., Bax, M., Sánchez-Hernández, M., García-Vallejo, J.J., van Kooyk, Y., 2008. Glycan modification of the tumor antigen gp100 targets DC-SIGN to enhance dendritic cell induced antigen presentation to T cells. *Int. J. Cancer* 122, 839–846. <https://doi.org/10.1002/ijc.23101>

Anderluh, M., 2012. DC-SIGN Antagonists – A Paradigm of C-Type Lectin Binding Inhibition, in: Chang, C.-F. (Ed.), *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/50627>

Andersson, L., Porath, J., 1986. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe<sup>3+</sup>) affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 154, 250–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90523-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90523-3)

Aretz, J., Anumala, U.R., Fuchsberger, F.F., Molavi, N., Ziebart, N., Zhang, H., Nazaré, M., Rademacher, C., 2018. Allosteric Inhibition of a Mammalian Lectin. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 14915–14925. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b08644>

Aretz, J., Baukmann, H., Shanina, E., Hanske, J., Wawrzinek, R., Zapol'skii, V.A., Seeburger, P.H., Kaufmann, D.E., Rademacher, C., 2017. Identification of Multiple Drug-gable Secondary Sites by Fragment Screening against DC-SIGN. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 56, 7292–7296. <https://doi.org/10.1002/anie.201701943>

Arora, S., Saxena, V., Ayyar, B.V., 2017. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. *Methods* 116, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.12.010>

Ayyar, B.V., Arora, S., Murphy, C., O'Kennedy, R., 2012. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods* 56, 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.10.007>

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767–811. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>

Bermejo-Jambrina, M., Eder, J., Helgers, L.C., Hertoghs, N., Nijmeijer, B.M., Stunnenberg, M., Geijtenbeek, T.B.H., 2018. C-Type Lectin Receptors in Antiviral Immunity and Viral Escape. *Front. Immunol.* 9, 590. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00590>

Borrebaeck, C.A.K., Loennerdal, B., Etzler, M.E., 1981. Metal ion content of Dolichos biflorus lectin and effect of divalent cations on lectin activity. *Biochemistry* 20, 4119–4122. <https://doi.org/10.1021/bi00517a026>

Brown, G.D., Willment, J.A., Whitehead, L., 2018. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 374–389. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0004-8>

Carson, M., Johnson, D.H., McDonald, H., Brouillette, C., DeLucas, L.J., 2007. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 63, 295–301. <https://doi.org/10.1107/S0907444906052024>

- Chaga, G.S., 2001. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *J. Biochem. Biophys. Methods* 49, 313–334. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00206-8)
- Chakravarthi, S., Jessop, C.E., Bulleid, N.J., 2006. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep.* 7, 271–275. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400645>
- Cheung, R.C.F., Wong, J.H., Ng, T.B., 2012. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 1411–1420. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4507-0>
- Chiodo, F., Marradi, M., Park, J., Ram, A.F.J., Penadés, S., van Die, I., Tefsen, B., 2014. Galactofuranose-coated gold nanoparticles elicit a pro-inflammatory response in human monocyte-derived dendritic cells and are recognized by DC-SIGN. *ACS Chem. Biol.* 9, 383–389. <https://doi.org/10.1021/cb4008265>
- Coppenhaver, D.H., 1986. [28] Nickel chelate chromatography of human immune interferon, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 199–204. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)19030-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)19030-6)
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A., Domingues, L., 2014. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00063>
- Costa, S.J., Almeida, A., Castro, A., Domingues, L., Besir, H., 2013. The novel Fh8 and H fusion partners for soluble protein expression in *Escherichia coli*: a comparison with the traditional gene fusion technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6779–6791. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4559-1>
- D'Alatri, L., Di Massimo, A.M., Anastasi, A.M., Pacilli, A., Novelli, S., Saccinto, M.P., De Santis, R., Mele, A., Parente, D., 1998. Production and characterisation of a recombinant single-chain anti ErbB2-clavin immunotoxin. *Anticancer Res.* 18, 3369–3373.
- de Jong, E.C., Vieira, P.L., Kalinski, P., Schuitemaker, J.H.N., Tanaka, Y., Wierenga, E.A., Yazdanbakhsh, M., Kapsenberg, M.L., 2002. Microbial Compounds Selectively Induce Th1 Cell-Promoting or Th2 Cell-Promoting Dendritic Cells In Vitro with Diverse Th Cell-Polarizing Signals. *J. Immunol.* 168, 1704–1709. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.4.1704>
- de Witte, L., Abt, M., Schneider-Schaulies, S., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B.H., 2006. Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J. Virol.* 80, 3477–3486. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3477-3486.2006>
- Denda-Nagai, K., Irimura, T., 2000. MUC1 in carcinoma-host interactions. *Glycoconj. J.* 17, 649–658. <https://doi.org/10.1023/a:1011039013134>

- Dong, H., Nilsson, L., Kurland, C.G., 1996. Co-variation of tRNA Abundance and Codon Usage in *Escherichia coli* at Different Growth Rates. *J. Mol. Biol.* 260, 649–663. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0428>
- Drickamer, K., 1999. C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 585–590. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(99\)00009-3](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(99)00009-3)
- Engering, A., Geijtenbeek, T.B.H., van Vliet, S.J., Wijers, M., van Liempt, E., Demaurex, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C.G., Piguet, V., van Kooyk, Y., 2002. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 2118–2126. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.5.2118>
- Ernst, B., Magnani, J.L., 2009. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 661–677. <https://doi.org/10.1038/nrd2852>
- Esfandiari, S., Hashemi-Najafabadi, S., Shojaosadati, S.A., Sarrafzadeh, S.A., Pourpak, Z., 2010. Purification and refolding of *Escherichia coli* -expressed recombinant human interleukin-2. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 55, 209–214. <https://doi.org/10.1042/BA20090256>
- Figdor, C.G., van Kooyk, Y., Adema, G.J., 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 77–84. <https://doi.org/10.1038/nri723>
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., Underhill, D.M., 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197, 1107–1117. <https://doi.org/10.1084/jem.20021787>
- Geijtenbeek, T.B.H., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C.F., Middel, J., Cornelissen, I.L.M.H.A., Nottet, H.S.L.M., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G., van Kooyk, Y., 2000a. DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-Infection of T Cells. *Cell* 100, 587–597. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80694-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80694-7)
- Geijtenbeek, T.B.H., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C.F., Adema, G.J., van Kooyk, Y., Figdor, C.G., 2000b. Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Receptor that Supports Primary Immune Responses. *Cell* 100, 575–585. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80693-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80693-5)
- Geijtenbeek, T.B.H., van Kooyk, Y., 2003. Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 111, 698–714. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.11107803.x>
- Geijtenbeek, T.B.H., van Vliet, S.J., Engering, A., 't Hart, B.A., van Kooyk, Y., 2004. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 33–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104558>

- Geijtenbeek, T.B.H., Van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandembroucke-Grauls, C.M.J.E., Appelmelk, B., Van Kooyk, Y., 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J. Exp. Med.* 197, 7–17. <https://doi.org/10.1084/jem.20021229>
- Georgiou, G., Segatori, L., 2005. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.07.008>
- Hage, D.S., Anguizola, J.A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfaunmiller, E., Vargas, J., Zheng, X., 2012. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 69, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.004>
- Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houlès, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J.F., Déchanet-Merville, J., 2002. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell transinfection. *Immunity* 17, 653–664. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00447-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00447-8)
- Harper, S., Speicher, D.W., 2011. Purification of Proteins Fused to Glutathione S-Transferase, in: Walls, D., Loughran, S.T. (Eds.), *Protein Chromatography, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 259–280. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_14)
- He, L.-Z., Crocker, A., Lee, J., Mendoza-Ramirez, J., Wang, X.-T., Vitale, L.A., O'Neill, T., Petromilli, C., Zhang, H.-F., Lopez, J., Rohrer, D., Keler, T., Clynes, R., 2007. Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 6259–6267. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6259>
- Hockney, R.C., 1994. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 12, 456–463. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90021-3)
- Hou, H., Guo, Y., Chang, Q., Luo, T., Wu, X., Zhao, X., 2017. C-type Lectin Receptor: Old Friend and New Player. *Med. Chem. Shariqah United Arab Emir.* 13, 536–543. <https://doi.org/10.2174/1573406413666170510103030>
- Janeway, C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Johannssen, T., Lepenies, B., 2017. Glycan-Based Cell Targeting To Modulate Immune Responses. *Trends Biotechnol.* 35, 334–346. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.10.002>
- Jones, C., Patel, A., Griffin, S., Martin, J., Young, P., O'Donnell, K., Silverman, C., Porter, T., Chaiken, I., 1995. Current trends in molecular recognition and bioseparation. *J. Chromatogr. A* 707, 3–22. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00466-Z](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00466-Z)

- Kågedal, L., 2011. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, in: Janson, J.-C. (Ed.), *Methods of Biochemical Analysis*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 183–201. <https://doi.org/10.1002/9780470939932.ch7>
- Kane, J.F., 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 494–500. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80082-4](https://doi.org/10.1016/0958-1669(95)80082-4)
- Kapsenberg, M.L., 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 984–993. <https://doi.org/10.1038/nri1246>
- Kaur, Jashandeep, Kumar, A., Kaur, Jagdeep, 2018. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *Int. J. Biol. Macromol.* 106, 803–822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Kingeter, L.M., Lin, X., 2012. C-type lectin receptor-induced NF- $\kappa$ B activation in innate immune and inflammatory responses. *Cell. Mol. Immunol.* 9, 105–112. <https://doi.org/10.1038/cmi.2011.58>
- Koppel, E.A., Saeland, E., de Cooker, D.J.M., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B.H., 2005. DC-SIGN specifically recognizes *Streptococcus pneumoniae* serotypes 3 and 14. *Immunobiology* 210, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.05.014>
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S., 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* 30, 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
- Kurland, C., Gallant, J., 1996. Errors of heterologous protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 489–493. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80050-4](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80050-4)
- Kwon, D.S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W.A., Littman, D.R., 2002. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 16, 135–144. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00259-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00259-5)
- Lin, G., Simmons, G., Pöhlmann, S., Baribaud, F., Ni, H., Leslie, G.J., Haggarty, B.S., Bates, P., Weissman, D., Hoxie, J.A., Doms, R.W., 2003. Differential N-linked glycosylation of human immunodeficiency virus and Ebola virus envelope glycoproteins modulates interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Virol.* 77, 1337–1346. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.2.1337-1346.2003>
- Lönnerdal, B., Carlsson, J., Porath, J., 1977. Isolation of lactoferrin from human milk by metal-chelate affinity chromatography. *FEBS Lett.* 75, 89–92. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(77\)80059-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(77)80059-8)
- Malhotra, A., 2009. Chapter 16 Tagging for Protein Expression, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 239–258. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63016-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63016-0)
- Marzi, A., Gramberg, T., Simmons, G., Möller, P., Rennekamp, A.J., Krumbiegel, M., Geier, M., Eisemann, J., Turza, N., Saunier, B., Steinkasserer, A., Becker, S., Bates, P., Hofmann, H., Pöhlmann, S., 2004. DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycopro-

- tein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 78, 12090–12095. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.12090-12095.2004>
- Mellman, I., Turley, S.J., Steinman, R.M., 1998. Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol.* 8, 231–237. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(98\)01276-8](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(98)01276-8)
- Mitchell, D.A., Fadden, A.J., Drickamer, K., 2001. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J. Biol. Chem.* 276, 28939–28945. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104565200>
- Monguió-Tortajada, M., Gálvez-Montón, C., Bayes-Genis, A., Roura, S., Borràs, F.E., 2019. Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 2369–2382. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03071-y>
- Ng, K.K., Weis, W.I., 1998. Coupling of prolyl peptide bond isomerization and Ca<sup>2+</sup> binding in a C-type mannose-binding protein. *Biochemistry* 37, 17977–17989. <https://doi.org/10.1021/bi9819733>
- Nishiyama, Y., Hardré-Liénard, H., Miras, S., Miège, C., Block, M.A., Revah, F., Joyard, J., Maréchal, E., 2003. Refolding from denatured inclusion bodies, purification to homogeneity and simplified assay of MGDG synthases from land plants. *Protein Expr. Purif.* 31, 79–87. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00158-X](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00158-X)
- Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., Ghosh, S., 2011. Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* 12, 695–708. <https://doi.org/10.1038/ni.2065>
- Petsch, D., 2000. Endotoxin removal from protein solutions. *J. Biotechnol.* 76, 97–119. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00185-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00185-6)
- Pöhlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R.W., Rice, C.M., McKeating, J.A., 2003. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Virol.* 77, 4070–4080. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.7.4070-4080.2003>
- Polisky, B., Bishop, R.J., Gelfand, D.H., 1976. A plasmid cloning vehicle allowing regulated expression of eukaryotic DNA in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 3900–3904. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.11.3900>
- Pontis, H.G., 2017. Protein and Carbohydrate Separation and Purification, in: *Methods for Analysis of Carbohydrate Metabolism in Photosynthetic Organisms*. Elsevier, pp. 45–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803396-8.00003-X>
- Porath, J., 1992. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* 3, 263–281. [https://doi.org/10.1016/1046-5928\(92\)90001-D](https://doi.org/10.1016/1046-5928(92)90001-D)
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G., 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598–599. <https://doi.org/10.1038/258598a0>

- Robinson, R.L., Neely, A.E., Mojadedi, W., Threatt, K.N., Davis, N.Y., Weiland, M.H., 2017. Using an FPLC to promote active learning of the principles of protein structure and purification: Using an FPLC to Promote Active Learning. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 45, 60–68. <https://doi.org/10.1002/bmb.20980>
- Ryś, S., Muca, R., Kołodziej, M., Piątkowski, W., Dürauer, A., Jungbauer, A., Antos, D., 2015. Design and optimization of protein refolding with crossflow ultrafiltration. *Chem. Eng. Sci.* 130, 290–300. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.03.035>
- Savitsky, P., Bray, J., Cooper, C.D.O., Marsden, B.D., Mahajan, P., Burgess-Brown, N.A., Gileadi, O., 2010. High-throughput production of human proteins for crystallization: The SGC experience. *J. Struct. Biol.* 172, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.008>
- Sawadogo, M., Van Dyke, M.W., 1995. Indirect use of immobilized metal affinity chromatography for isolation and characterization of protein partners. *Genet. Eng. (N. Y.)* 17, 53–65.
- Schmidt, F.R., 2004. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 363–372. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1656-9>
- Singh, S.M., Panda, A.K., 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 303–310. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>
- Singhvi, P., Saneja, A., Srichandan, S., Panda, A.K., 2020. Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. *Trends Biotechnol.* 38, 474–486. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.011>
- Striegel, A.M. (Ed.), 2009. *Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography*, 2nd ed. ed. Wiley, Hoboken, N.J.
- Svajger, U., Anderluh, M., Jeras, M., Obermajer, N., 2010. C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell. Signal.* 22, 1397–1405. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.03.018>
- Tassaneeritthep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D.L., Steinman, R.M., Schlesinger, S., Marovich, M.A., 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197, 823–829. <https://doi.org/10.1084/jem.20021840>
- Teeters, M.A., Conrardy, S.E., Thomas, B.L., Root, T.W., Lightfoot, E.N., 2003. Adsorptive membrane chromatography for purification of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A* 989, 165–173. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00027-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00027-X)
- Terpe, K., 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 211–222. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8>

- Uliyanchenko, E., 2014. Size-exclusion chromatography—from high-performance to ultra-performance. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 6087–6094. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8041-z>
- Unger, W.W.J., van Kooyk, Y., 2011. “Dressed for success” C-type lectin receptors for the delivery of glyco-vaccines to dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.11.011>
- Vallejo, L.F., Rinas, U., 2004. Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration. *Biotechnol. Bioeng.* 85, 601–609. <https://doi.org/10.1002/bit.10906>
- van Kooyk, Y., 2008. C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1478–1481. <https://doi.org/10.1042/BST0361478>
- van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B.H., 2003. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 697–709. <https://doi.org/10.1038/nri1182>
- van Kooyk, Y., Unger, W.W.J., Fehres, C.M., Kalay, H., García-Vallejo, J.J., 2013. Glycan-based DC-SIGN targeting vaccines to enhance antigen cross-presentation. *Mol. Immunol.* 55, 143–145. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.10.031>
- Westers, L., Westers, H., Quax, W.J., 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1694, 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.02.011>
- Wong, J.W., Albright, R.L., Wang, N.-H.L., 1991. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) Chemistry and Bioseparation Applications. *Sep. Purif. Methods* 20, 49–106. <https://doi.org/10.1080/03602549108021408>
- Wu, J., Lin, K., Zeng, J., Liu, W., Yang, F., Wang, X., Xiao, Y., Guo, X., Nie, H., Zhou, T., Xu, C., 2014. Role of DC-SIGN in *Helicobacter pylori* infection of gastrointestinal cells. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 19, 825–834. <https://doi.org/10.2741/4250>
- Yasuda, M., Murakami, Y., Sowa, A., Ogino, H., Ishikawa, H., 1998. Effect of Additives on Refolding of a Denatured Protein. *Biotechnol. Prog.* 14, 601–606. <https://doi.org/10.1021/bp9800438>
- Zelensky, A.N., Gready, J.E., 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 272, 6179–6217. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x>
- Zhao, X., Li, G., Liang, S., 2013. Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification. *J. Anal. Methods Chem.* 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/581093>
- Zhou, T., Chen, Y., Hao, L., Zhang, Y., 2006. DC-SIGN and immunoregulation. *Cell. Mol. Immunol.* 3, 279–283.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung einer typischen CTLD	8
Abbildung 2: schematische Struktur von DC-SIGN	15
Abbildung 3: Position der Mutationen in DC-SIGN	19
Abbildung 4: Autosampler und FPLC-Anlage	36
Abbildung 5: Module der FPLC-Anlage	38
Abbildung 6: Chromatogramm von DC-SIGN CRD WT	47
Abbildung 7: überlagertes Chromatogramm von neun hintereinander aufgereinigten DC-SIGN CRD Mutanten	48
Abbildung 8: HRP-Assay	52
Abbildung 9: HRP-Assay 2	52
Abbildung 10: Diagramm der EC <sub>50</sub> -Werte von DC-SIGN ECD und seinen Mutanten	53
Abbildung 11: NGC Discover 10 Pro System mit einem zusätzlichem Column switching valve	56

## Tabellenverzeichnis

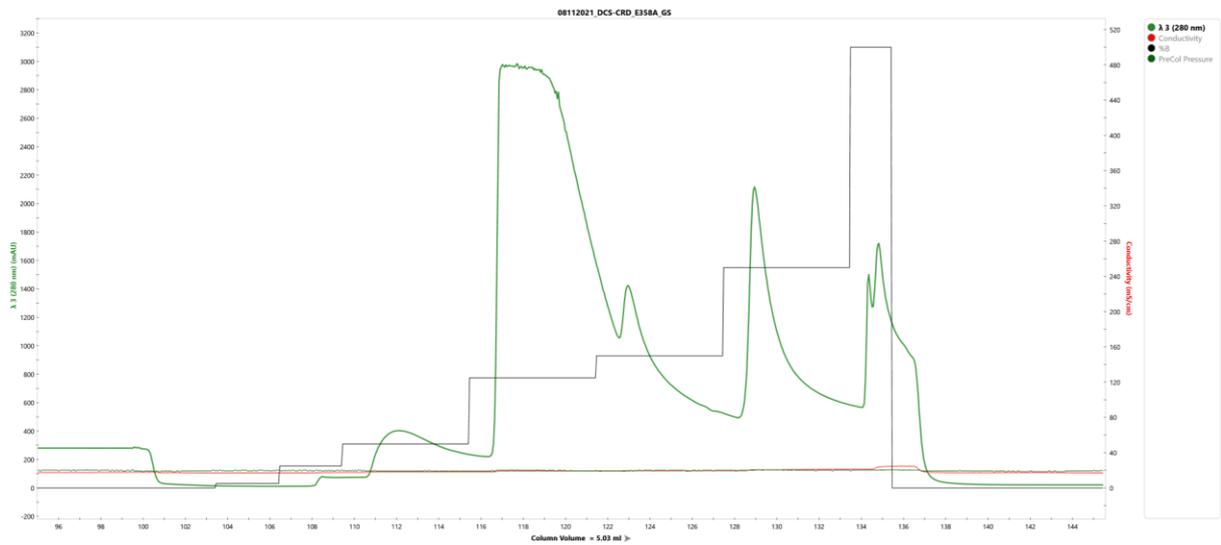
Tabelle 1: Zusammensetzung von 10x TBS	41
Tabelle 2: Zusammensetzung von 10x MCBB	41
Tabelle 3: Zusammensetzung von 2x CTLR Rückfaltungspuffer	42
Tabelle 4: Zusammensetzung des Lyse-Puffers	42
Tabelle 5: Zusammensetzung des Denaturierungspuffers	42
Tabelle 6: Zusammensetzung von 10x HBS	42
Tabelle 7: Zusammensetzung von 10x MES	42
Tabelle 8: Zusammensetzung des ELISA-Waschpuffers	43
Tabelle 9: Zusammensetzung des ELISA-Blockpuffers	43
Tabelle 10: Zusammensetzung von M9-Minimalmedium	44
Tabelle 11: Zusammensetzung der 10x M9-Salze	44
Tabelle 12: Zusammensetzung des 100x Trace metal-Mixes	44
Tabelle 13: Zusammensetzung des 500x Vitaminmixes	45
Tabelle 14: Ausbeuten von DC-SIGN CRD und den Mutanten (in mg/L Kultur)	49
Tabelle 15: Ausbeuten von DC-SIGN ECD und den Mutanten (in mg/L Kultur)	49
Tabelle 16: Mittelwert der Absorption bei 450nm von DC-SIGN ECD und den Mutanten	50
Tabelle 17: EC <sub>50</sub> -Werte (in µg/mL) und R <sup>2</sup> von DC-SIGN ECD und den Mutanten, basierend auf dem HRP-Assay	53

## Abkürzungsverzeichnis

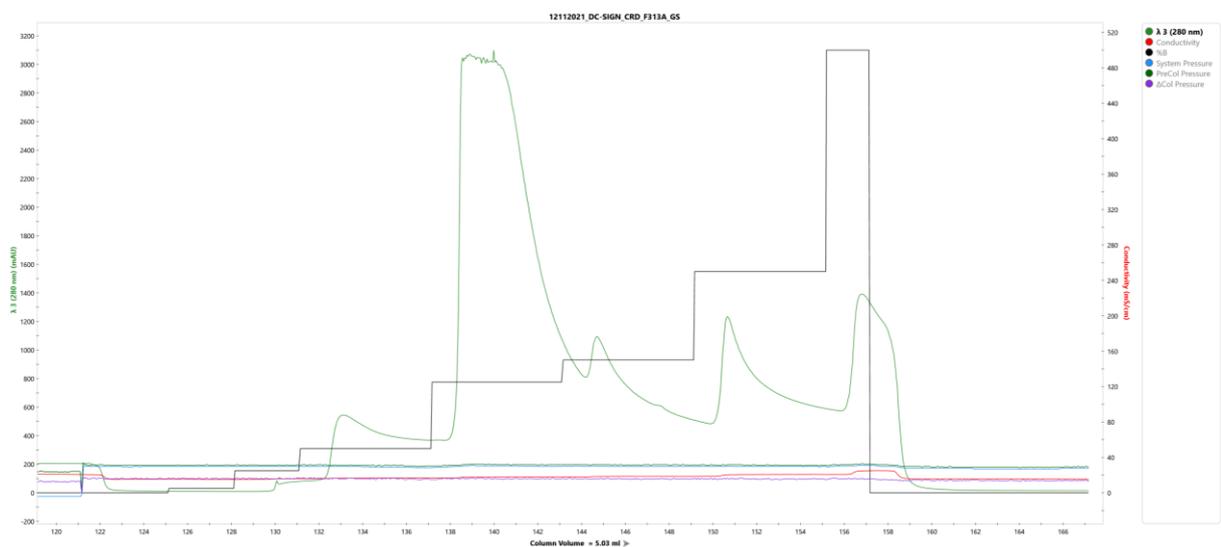
AC	Affinitätschromatographie
AG	Antigen
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
CBP	Chitinbindungsprotein
CBS	Kohlenhydratbindungsstelle (carbohydrate binding site)
CLRs	C-Typ Lektinrezeptoren
CRD	Kohlenhydraterkennungsdomäne (carbohydrate recognition domain)
CTLD	C-Typ-Lektin-Domäne/C-type lectin-like domain
DCs	Dendritische Zellen
DC-SIGN	DC-specific ICAM-3-grabbing non-integrin
ECD	extrazelluläre Domäne
E.coli	Escherichia coli
GBPs	glykanbindende Proteine
GST	Glutathion-S-Transferase
His-Tag	Poly-Histidin-Tag
HIV	humanes Immundefizienzvirus
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-4	Interleukin-4
IMAC	immobilized metal-affinity chromatography
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
MBP	Maltosebindungsprotein
NF-kappa B	nuclear factor kappa B
NLRs	NOD-like receptors
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PRRs	Pattern recognition Rezeptoren
RLRs	RIG-I-like receptors
SEC	Size-exclusion chromatography

SIM	Signal Import Module
SPR	surface plasmon resonance
TAA	tumour-associated antigens
TH1	Typ1-T-Helferzellen
TH2	Typ2-T-Helferzellen
TLR	Toll-like receptors
Treg	regulatorische T-Zellen
WT	Wildtyp

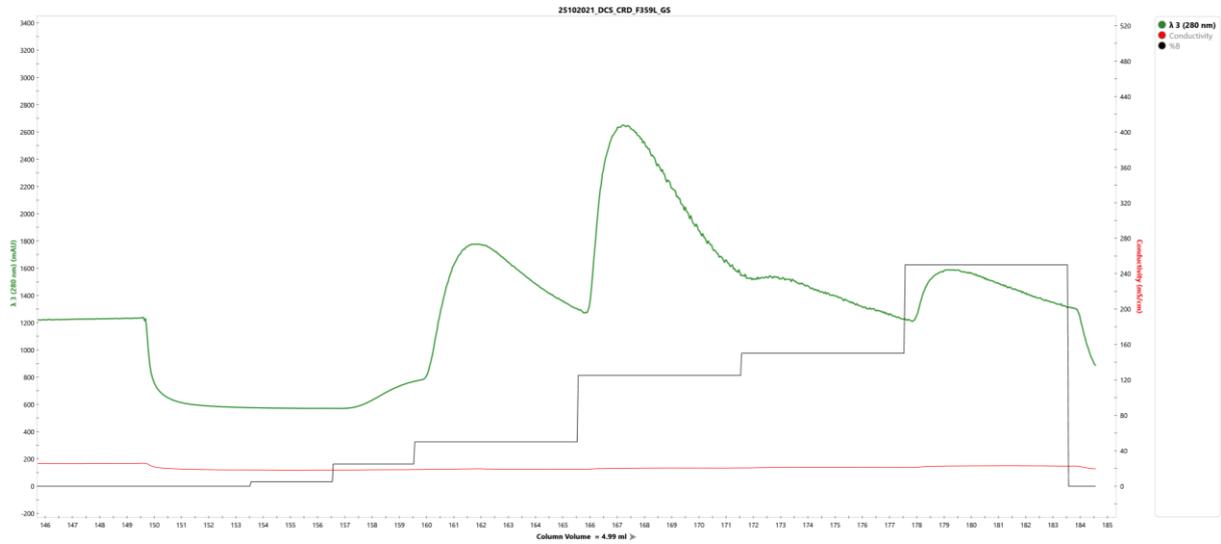
## Appendix



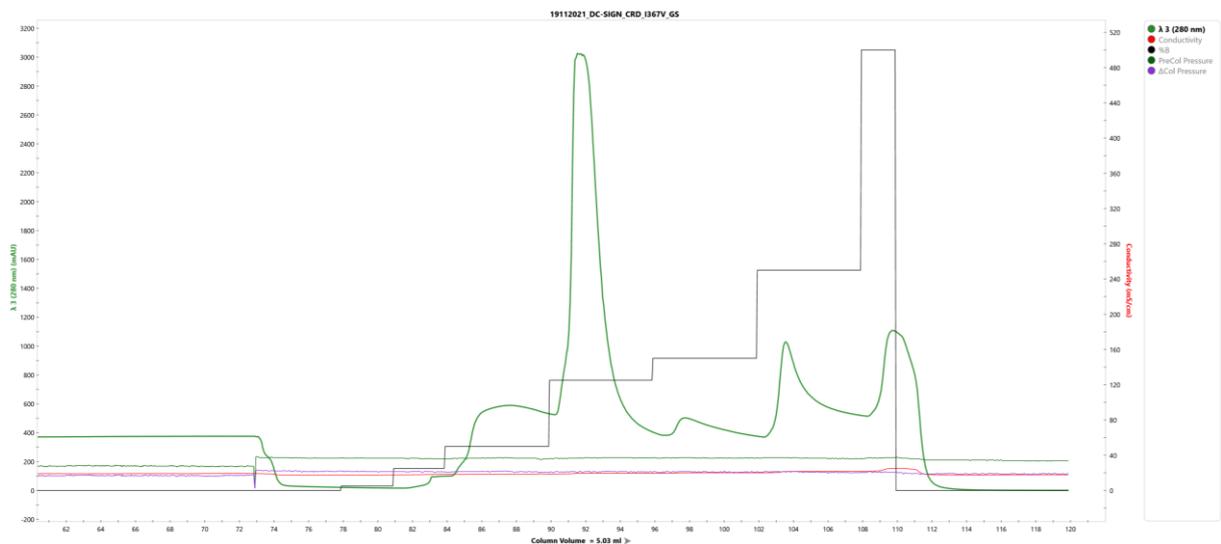
**Ergänzende Abbildung 1: Chromatogramm von DC-SIGN CRD E358A:** in grün ist die Absorption bei 280nm angezeigt; die schwarze Line zeigt Einsatz von Puffer B (1M Imidazol), dessen Anteil schrittweise erhöht wird, zur Elution des Proteins an.



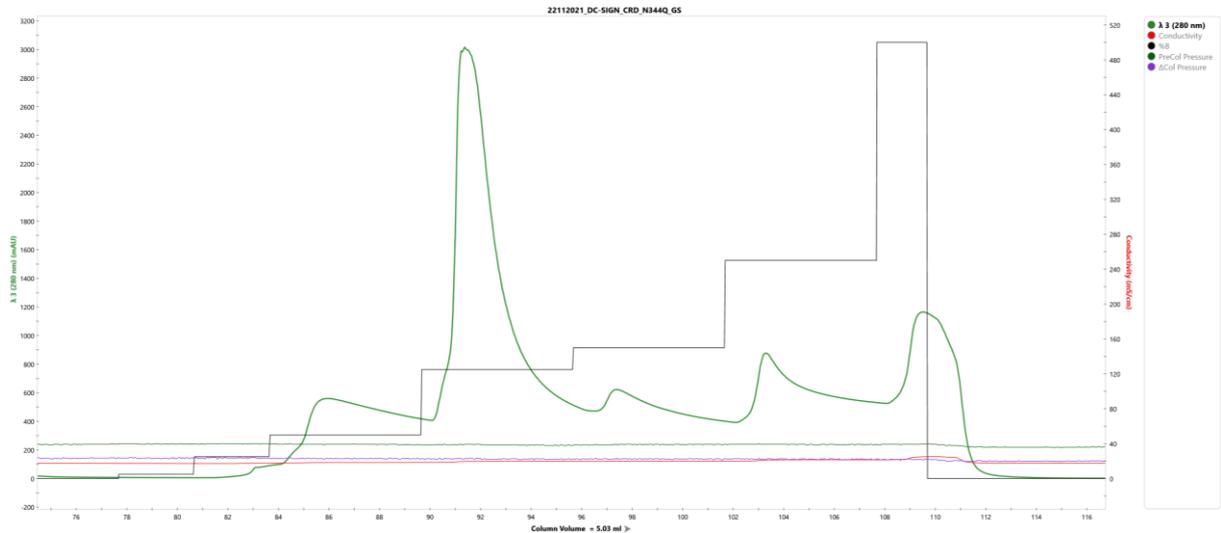
**Ergänzende Abbildung 2: Chromatogramm von DC-SIGN CRD F313A:** in grün ist die Absorption bei 280nm angezeigt; die schwarze Line zeigt Einsatz von Puffer B (1M Imidazol), dessen Anteil schrittweise erhöht wird, zur Elution des Proteins an.



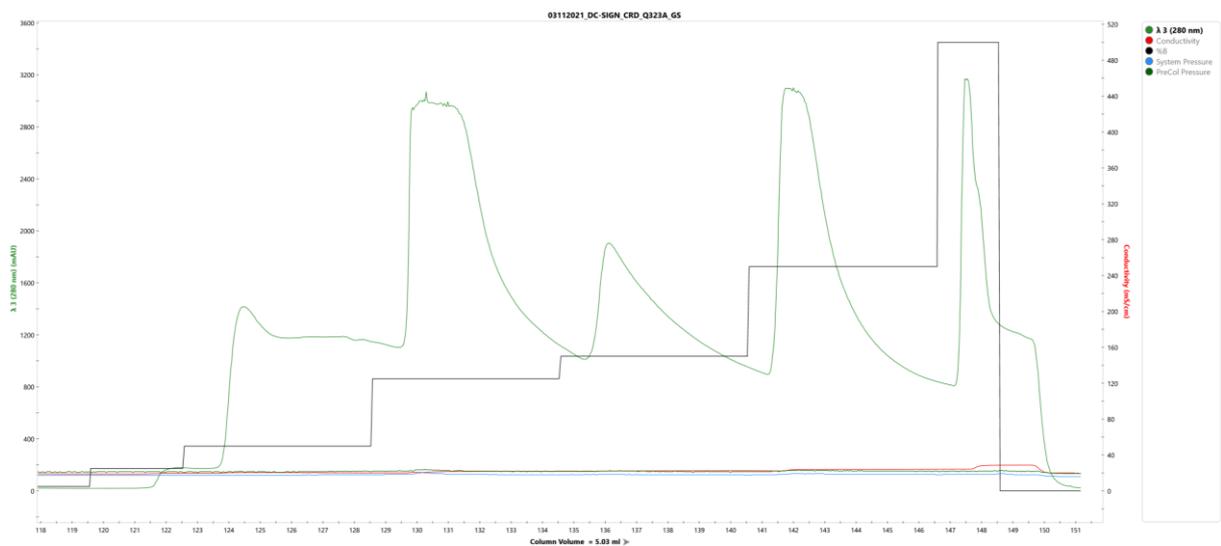
**Ergänzende Abbildung 3: Chromatogramm von DC-SIGN CRD F359L:** in grün ist die Absorption bei 280nm angezeigt; die schwarze Line zeigt Einsatz von Puffer B (1M Imidazol), dessen Anteil schrittweise erhöht wird, zur Elution des Proteins an.



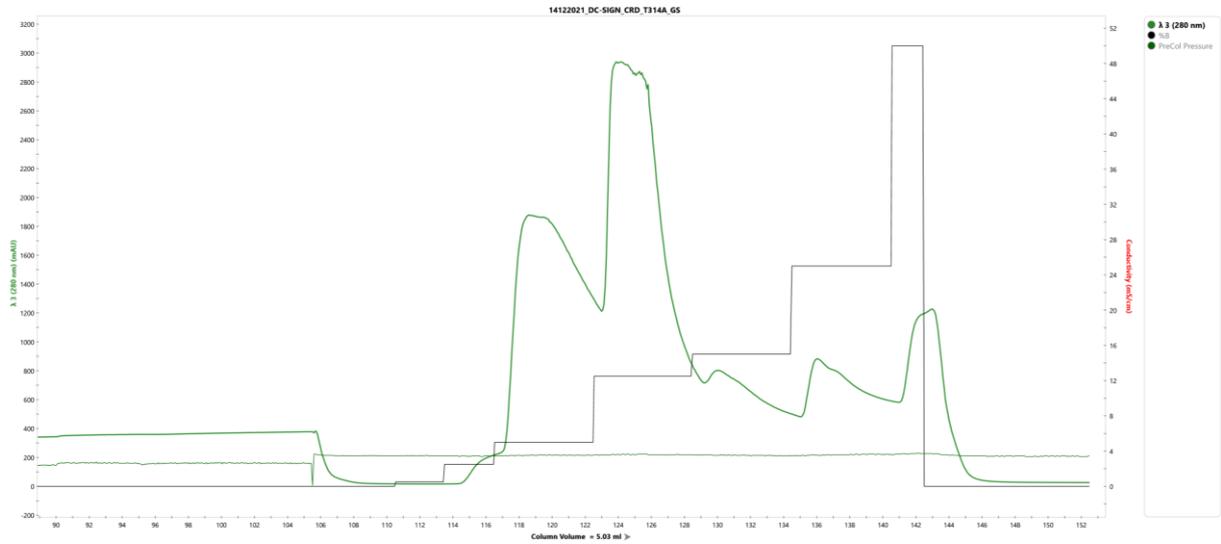
**Ergänzende Abbildung 4: Chromatogramm von DC-SIGN CRD I376V:** in grün ist die Absorption bei 280nm angezeigt; die schwarze Line zeigt Einsatz von Puffer B (1M Imidazol), dessen Anteil schrittweise erhöht wird, zur Elution des Proteins an.



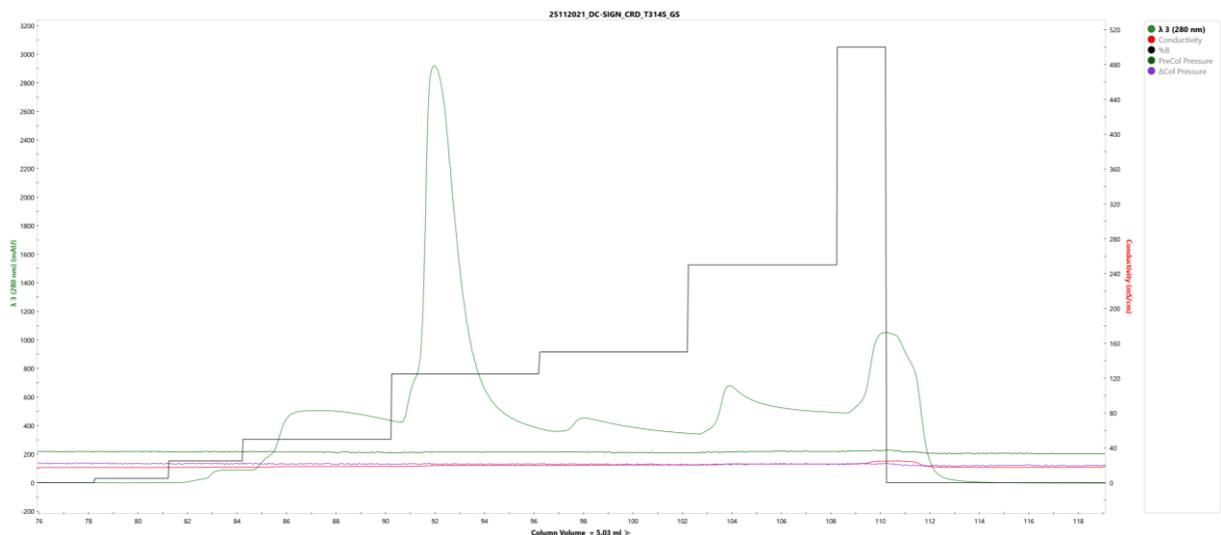
**Ergänzende Abbildung 5: Chromatogramm von DC-SIGN CRD N344Q:** in grün ist die Absorption bei 280nm angezeigt; die schwarze Line zeigt Einsatz von Puffer B (1M Imidazol), dessen Anteil schrittweise erhöht wird, zur Elution des Proteins an.



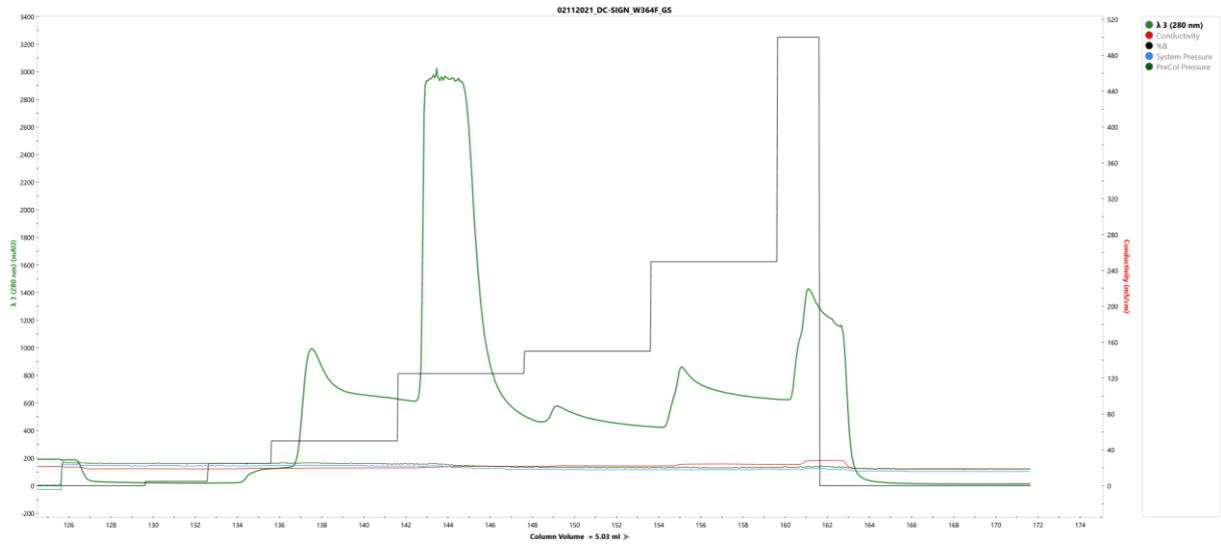
**Ergänzende Abbildung 6: Chromatogramm von DC-SIGN CRD Q323A:** in grün ist die Absorption bei 280nm angezeigt; die schwarze Line zeigt Einsatz von Puffer B (1M Imidazol), dessen Anteil schrittweise erhöht wird, zur Elution des Proteins an.



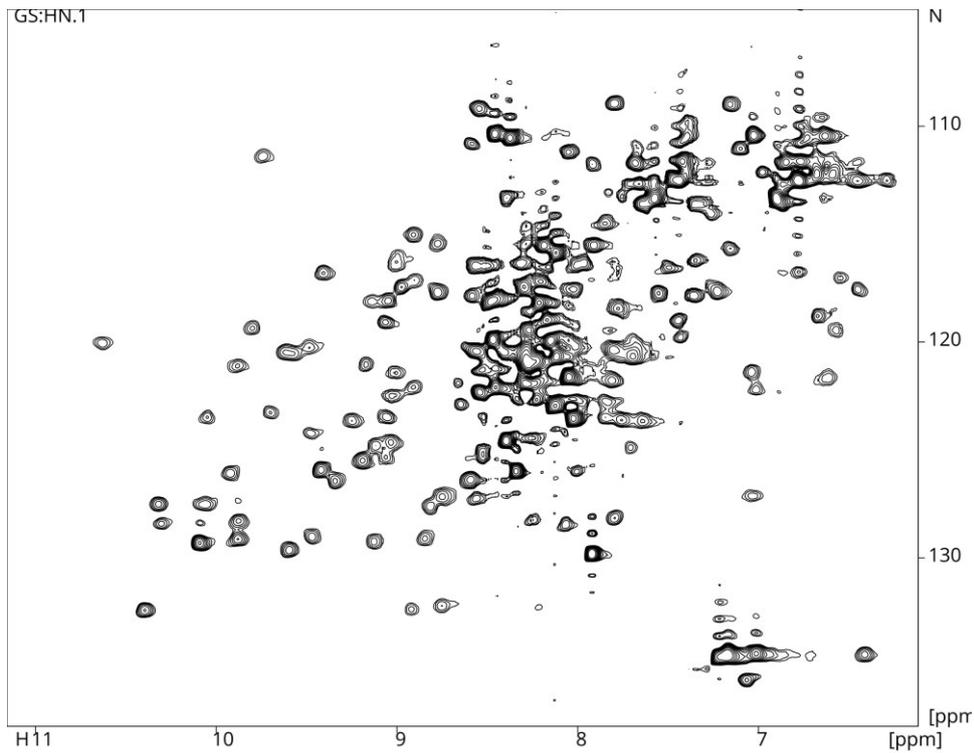
**Ergänzende Abbildung 7: Chromatogramm von DC-SIGN CRD T314A:** in grün ist die Absorption bei 280nm angezeigt; die schwarze Linie zeigt Einsatz von Puffer B (1M Imidazol), dessen Anteil schrittweise erhöht wird, zur Elution des Proteins an.



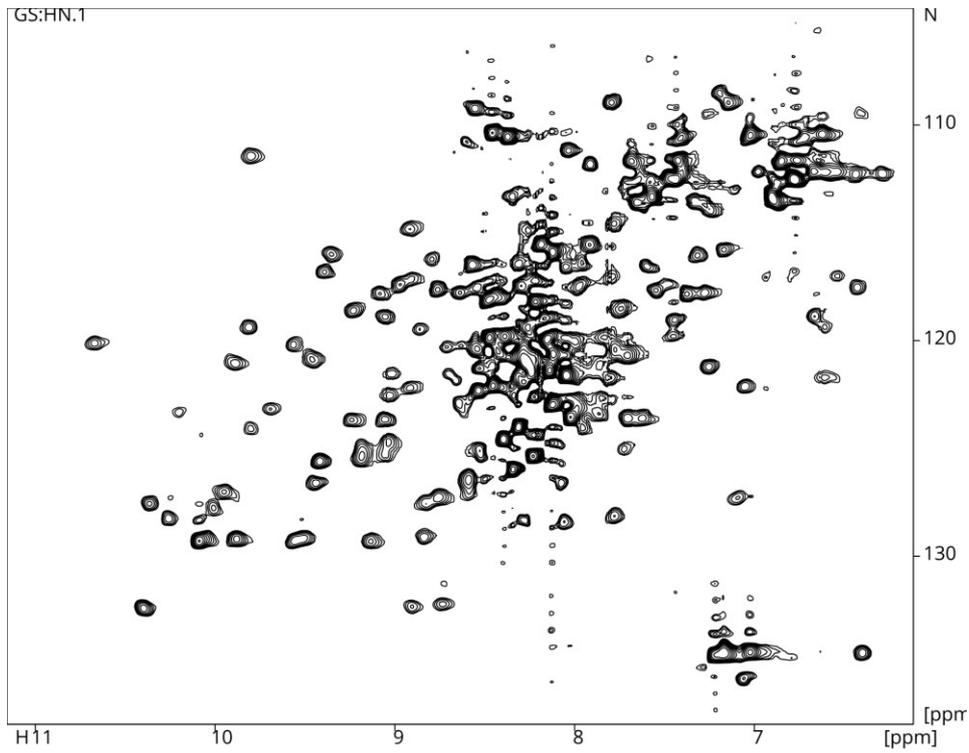
**Ergänzende Abbildung 8: Chromatogramm von DC-SIGN CRD T314S:** in grün ist die Absorption bei 280nm angezeigt; die schwarze Linie zeigt Einsatz von Puffer B (1M Imidazol), dessen Anteil schrittweise erhöht wird, zur Elution des Proteins an.



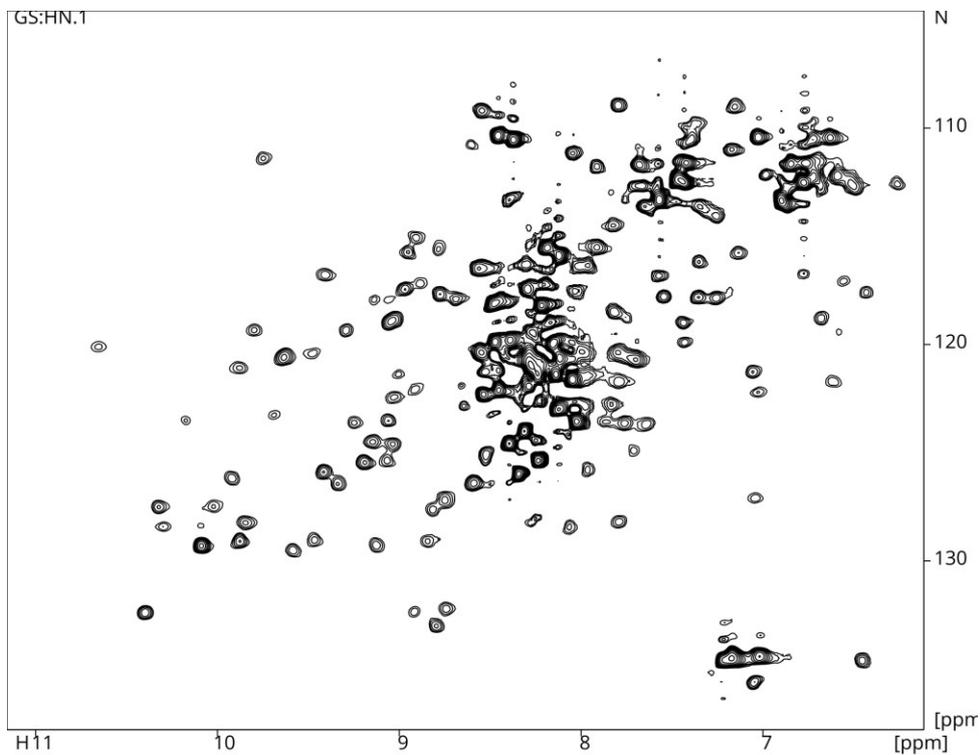
**Ergänzende Abbildung 9: Chromatogramm von DC-SIGN CRD W364F:** in grün ist die Absorption bei 280nm angezeigt; die schwarze Linie zeigt Einsatz von Puffer B (1M Imidazol), dessen Anteil schrittweise erhöht wird, zur Elution des Proteins an.



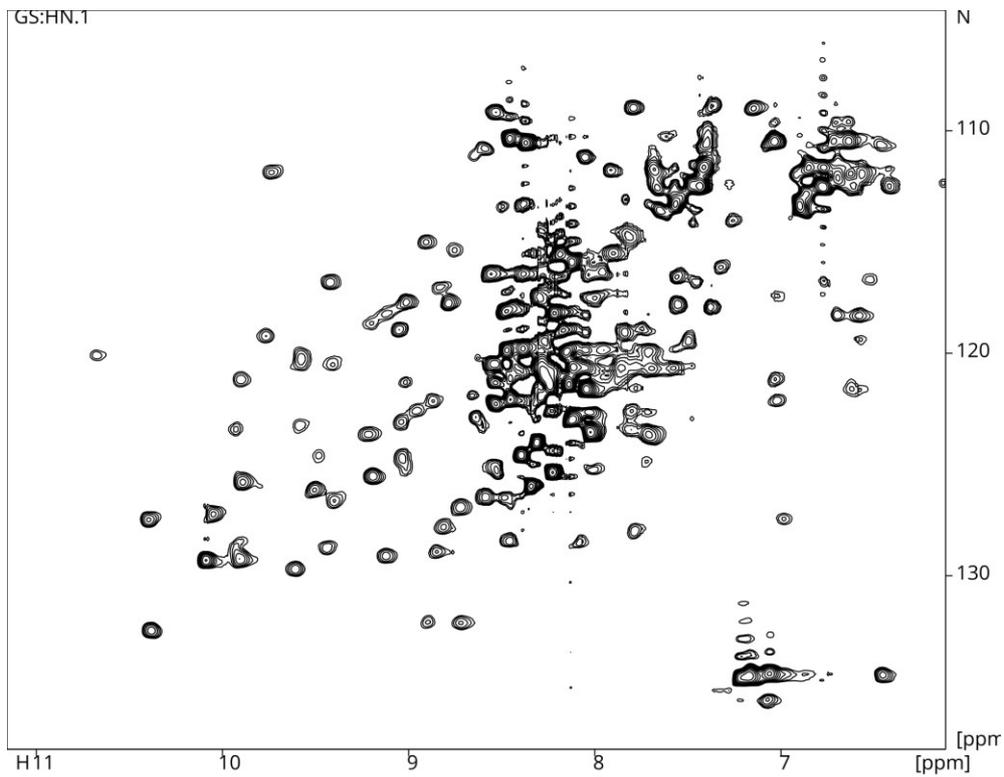
**Ergänzende Abbildung 10:  $^{15}\text{N}$  HSQC NMR spectrum of 100  $\mu\text{M}$  DC-SIGN CRD WT in the presence of 10 mM  $\text{CaCl}_2$  in MES buffer at pH 6.**



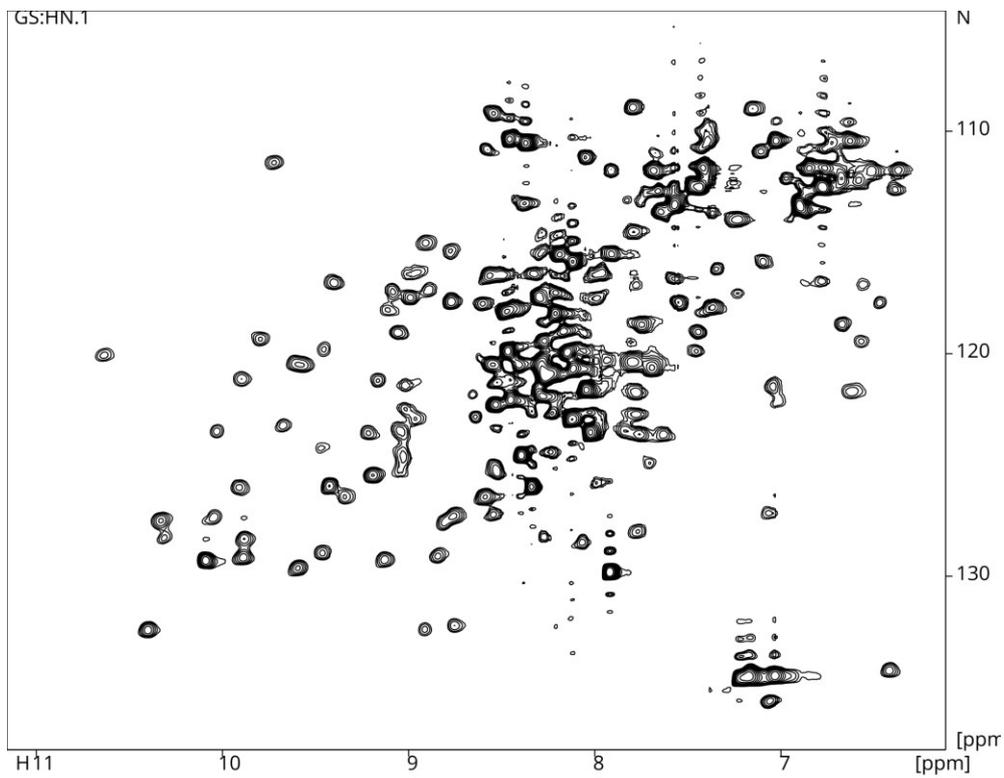
**Ergänzende Abbildung 11:**  $^{15}\text{N}$  HSQC NMR spectrum of 100  $\mu\text{M}$  DC-SIGN CRD E358A in the presence of 10 mM  $\text{CaCl}_2$  in MES buffer at pH 6.



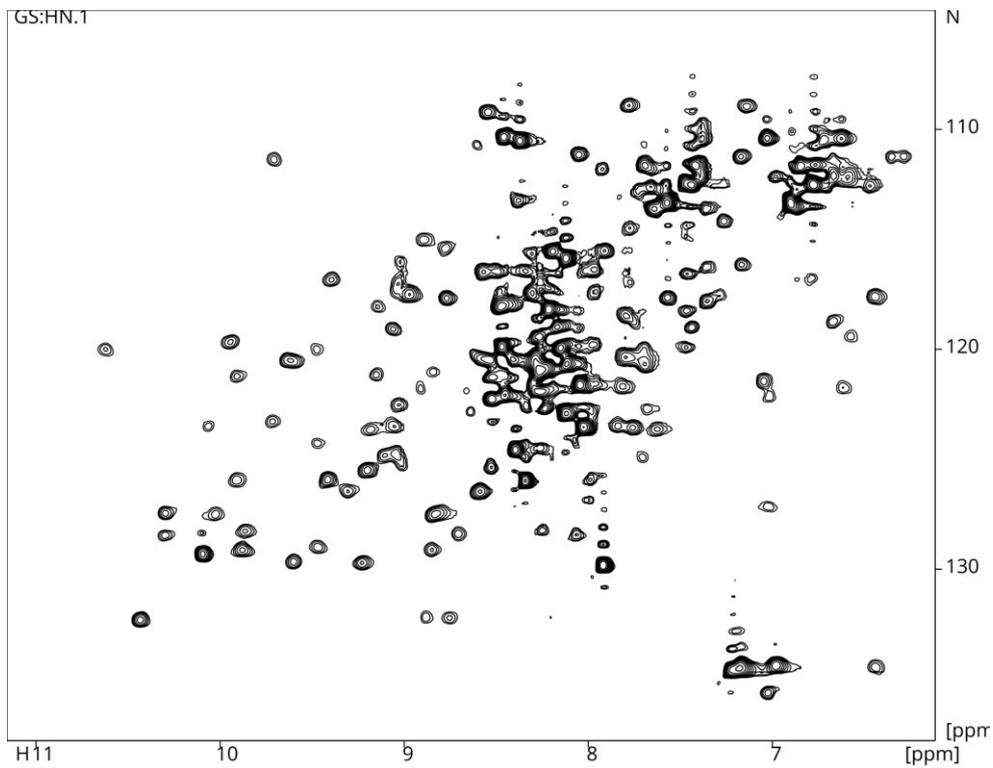
**Ergänzende Abbildung 12:**  $^{15}\text{N}$  HSQC NMR spectrum of 100  $\mu\text{M}$  DC-SIGN CRD F313A in the presence of 10 mM  $\text{CaCl}_2$  in MES buffer at pH 6.



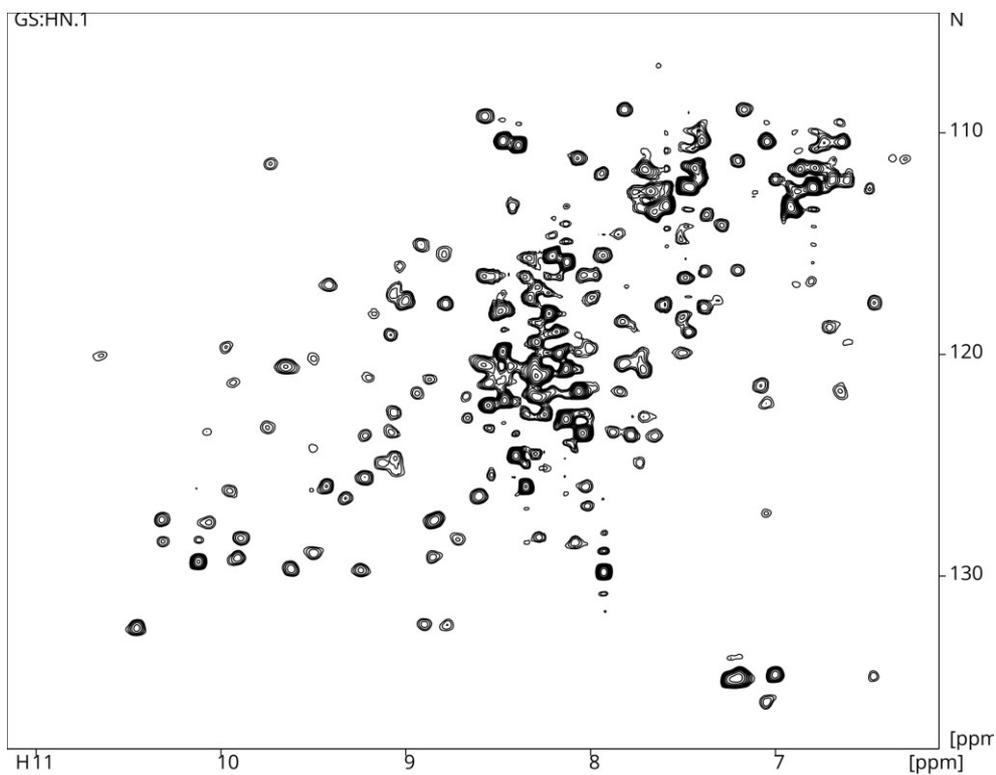
**Ergänzende Abbildung 13:**  $^{15}\text{N}$  HSQC NMR spectrum of 100  $\mu\text{M}$  DC-SIGN CRD F359L in the presence of 10 mM  $\text{CaCl}_2$  in MES buffer at pH 6.



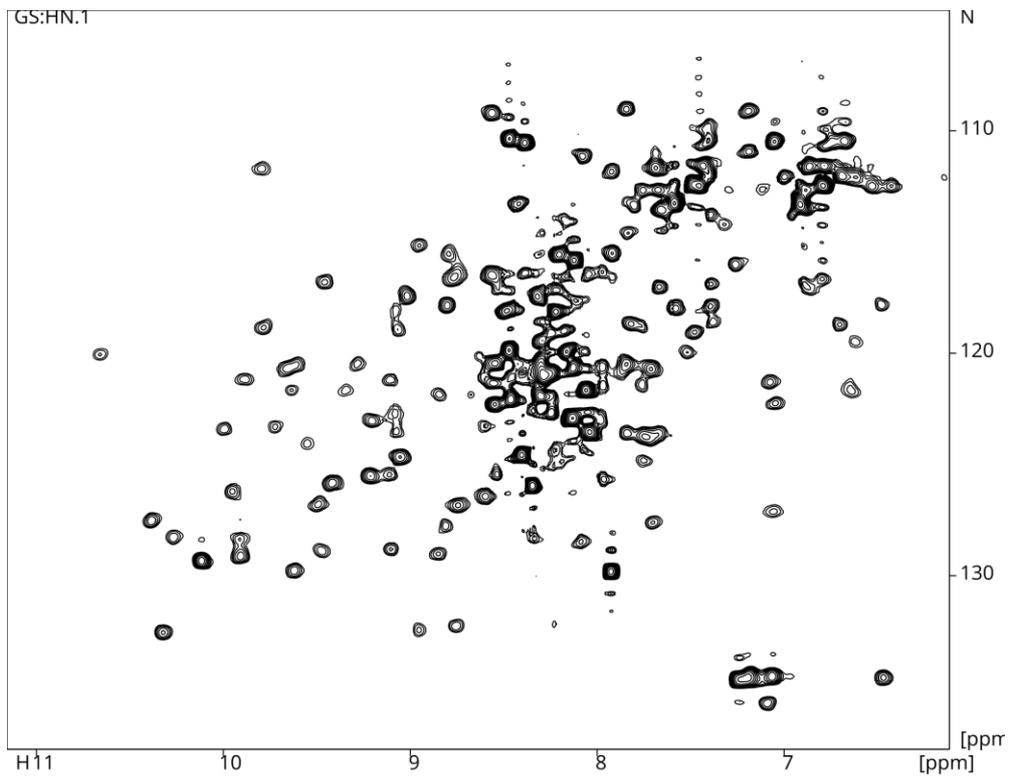
**Ergänzende Abbildung 14:**  $^{15}\text{N}$  HSQC NMR spectrum of 100  $\mu\text{M}$  DC-SIGN CRD I376V in the presence of 10 mM  $\text{CaCl}_2$  in MES buffer at pH 6.



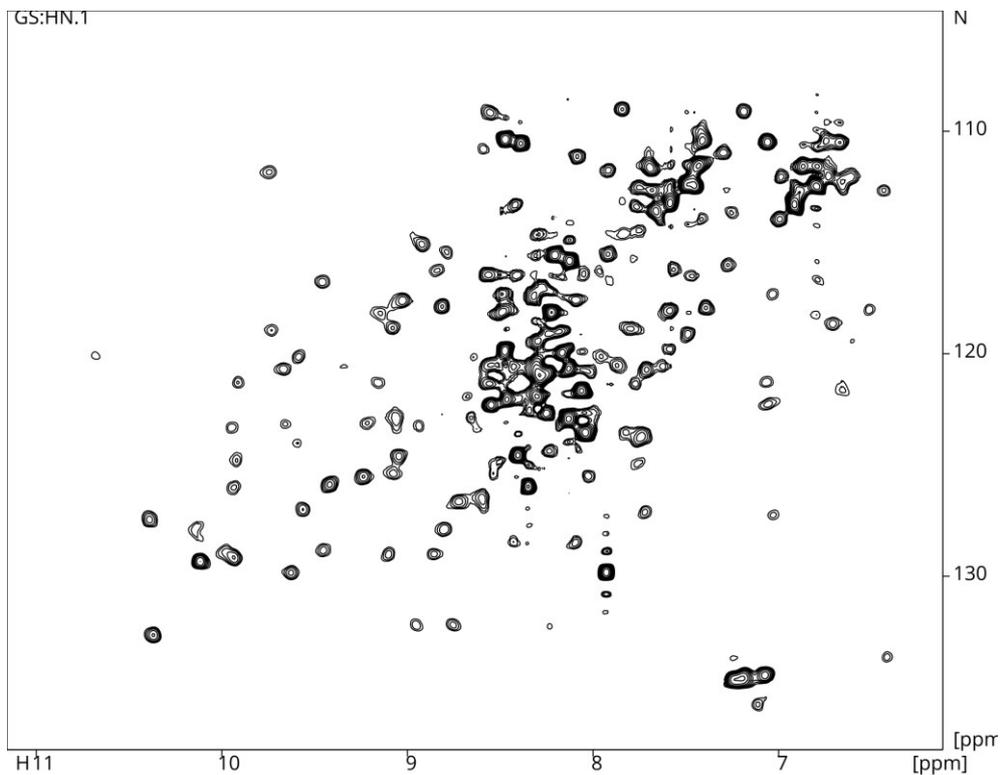
**Ergänzende Abbildung 15:**  $^{15}\text{N}$  HSQC NMR spectrum of 100  $\mu\text{M}$  DC-SIGN CRD M270F in the presence of 10 mM  $\text{CaCl}_2$  in MES buffer at pH 6.



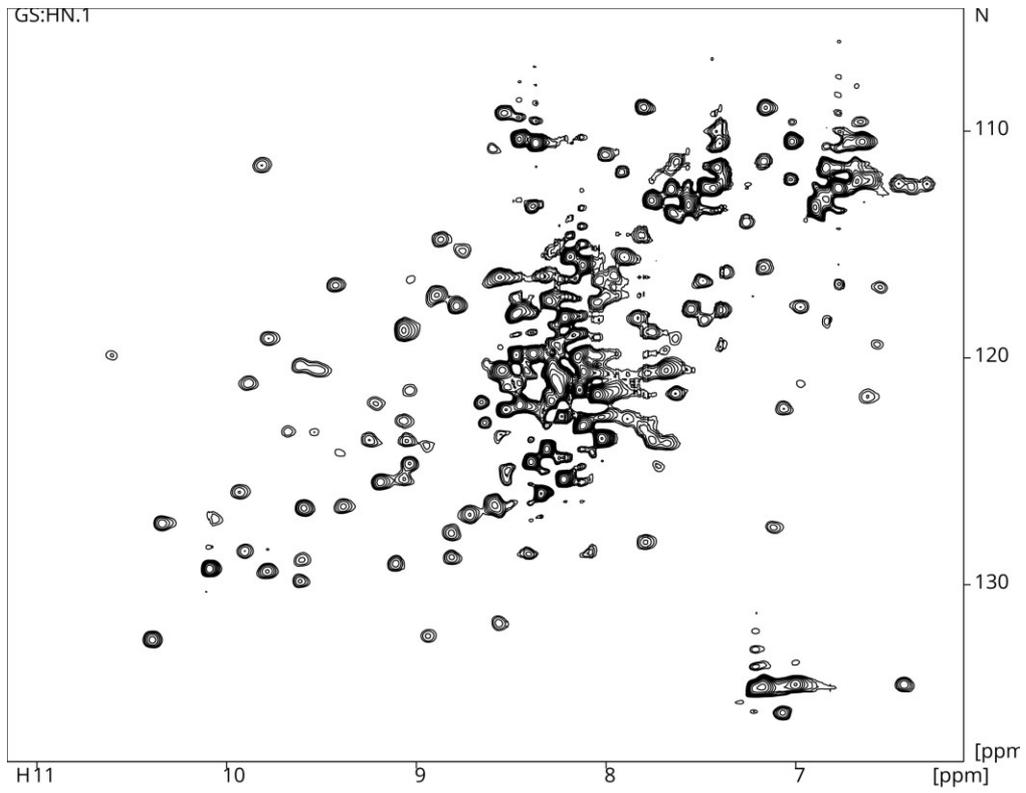
**Ergänzende Abbildung 16:**  $^{15}\text{N}$  HSQC NMR spectrum of 100  $\mu\text{M}$  DC-SIGN CRD N344Q in the presence of 10 mM  $\text{CaCl}_2$  in MES buffer at pH 6.



**Ergänzende Abbildung 17: <sup>15</sup>N HSQC NMR spectrum of 100 uM DC-SIGN CRD T314A in the presence of 10 mM CaCl<sub>2</sub> in MES buffer at pH 6.**



**Ergänzende Abbildung 18: <sup>15</sup>N HSQC NMR spectrum of 100 uM DC-SIGN CRD T314S in the presence of 10 mM CaCl<sub>2</sub> in MES buffer at pH 6.**



**Ergänzende Abbildung 19:**  $^{15}\text{N}$  HSQC NMR spectrum of 100  $\mu\text{M}$  DC-SIGN CRD W364F in the presence of 10 mM  $\text{CaCl}_2$  in MES buffer at pH 6.